

05.10.2004

日本国特許庁  
JAPAN PATENT OFFICE

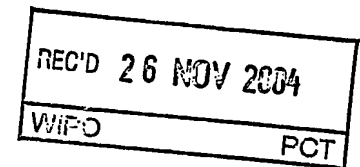
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日  
Date of Application: 2003年 9月30日

出願番号  
Application Number: 特願2003-339542  
[ST. 10/C]: [JP 2003-339542]

出願人  
Applicant(s): 独立行政法人理化学研究所  
株式会社ダナフォーム

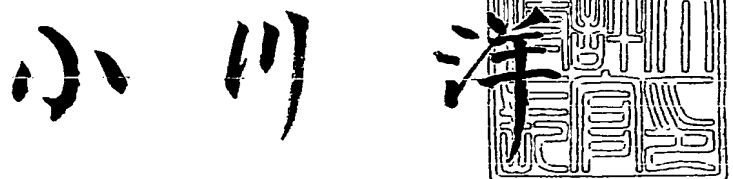


BEST AVAILABLE COPY

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月11日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office



【書類名】 特許願  
【整理番号】 P03-054  
【提出日】 平成15年 9月30日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 G01N  
C12M  
C12N

【発明者】  
【住所又は居所】 茨城県つくば市稲荷前 2 2 - 8  
【氏名】 林崎 良英

【発明者】  
【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3 番 3 5 番 株式会社ダナフォーム内  
【氏名】 神谷 守

【特許出願人】  
【識別番号】 000006792  
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号  
【氏名又は名称】 理化学研究所  
【代表者】 小林 俊一

【特許出願人】  
【住所又は居所】 東京都港区三田一丁目 3 番 3 5 号  
【氏名又は名称】 株式会社ダナフォーム

【代理人】  
【識別番号】 100098121  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 間山 世津子  
【電話番号】 045-290-7480

【選任した代理人】  
【識別番号】 100107870  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 野村 健一

【手数料の表示】  
【予納台帳番号】 093194  
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】  
【物件名】 特許請求の範囲 1  
【物件名】 明細書 1  
【物件名】 図面 1  
【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。

**【請求項 2】**

上記保護剤がトレハロース及びその誘導体からなる化合物群より選択される少なくとも一種の化合物である請求項 1 記載の支持体。

**【請求項 3】**

上記酵素に対するアプタマーをさらに含む請求項 1 又は 2 に記載の支持体。

**【請求項 4】**

酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体。

**【請求項 5】**

上記酵素が DNA ポリメラーゼである請求項 1 ないし 4 の何れか一項に記載の支持体。

**【請求項 6】**

さらに、上記 DNA ポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含んでなる請求項 5 記載の支持体。

**【請求項 7】**

さらに、上記 DNA ポリメラーゼを用いた核酸増幅反応の鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含んでなる請求項 5 に記載の支持体。

**【請求項 8】**

請求項 1 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を含む印刷物。

**【請求項 9】**

請求項 1 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を含む試薬キット。

**【請求項 10】**

請求項 1 記載の支持体を製造する方法であって、酵素及び保護剤の混合溶液を調製し、該溶液を支持体に適用し、該支持体を乾燥することにより、前記酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定することを含む前記の方法。

**【請求項 11】**

請求項 1 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を液体に浸漬させることにより、該液体中に酵素を溶出させることを含む、支持体に固定された酵素を再生する方法。

**【請求項 12】**

請求項 5 ないし 7 の何れか一項に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体より DNA ポリメラーゼを溶出させる工程と、当該 DNA ポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法。

## 【書類名】 明細書

【発明の名称】 酵素が固定されている支持体、印刷物、試薬キット、該支持体の製造法、酵素の保存法及び酵素の再生法

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は、酵素が固定されている支持体、印刷物、試薬キット、該支持体の製造法、酵素の保存法及び酵素の再生法に関する。

## 【背景技術】

## 【0002】

酵素は触媒活性を有するタンパク質であり、種々の生体反応を司ることにより、生命の維持に貢献している。

## 【0003】

酵素は、水分を含有した状態では室温で不安定である。それ故、凍結状態で保存されるか、あるいは $-20^{\circ}\text{C}$ 以下の温度で安定化剤とともに液体中で保存される。

## 【0004】

ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）は、DNAポリメラーゼという酵素により触媒される核酸増幅反応であるが、DNAポリメラーゼは通常バッファー中で $-20^{\circ}\text{C}$ の温度で保存される。このような保存のためには、冷凍庫が必要である。また、この酵素が供給者から使用者に配送されるにあたっては、ドライアイスとともに発泡スチロールなどの容器に箱詰めされる。これらの保存・配送方法は、特別の設備や作業を要するため、操作が煩雑で費用のかかるものである。

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0005】

本発明は、酵素を保存するための簡便な方法を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0006】

本発明者らは、DNAポリメラーゼをトレハロースと混合した状態で支持体に固定して保存した後、PCRを行ったところ、PCR反応が進行することを見出し、本発明を完成させるに至った。

## 【0007】

本発明の要旨は以下の通りである。

- (1) 酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。
- (2) 上記保護剤がトレハロース及びその誘導体からなる化合物群より選択される少なくとも一種の化合物である(1)記載の支持体。
- (3) 上記酵素に対するアプタマーをさらに含む(1)又は(2)に記載の支持体。
- (4) 酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体。
- (5) 上記酵素がDNAポリメラーゼである(1)ないし(4)の何れか一項に記載の支持体。
- (6) さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含んでなる(5)記載の支持体。
- (7) さらに、上記DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応の鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含んでなる(5)に記載の支持体。
- (8) (1)ないし(7)の何れか一項に記載の支持体を含む印刷物。
- (9) (1)ないし(7)の何れか一項に記載の支持体を含む試薬キット。
- (10) (1)記載の支持体を製造する方法であって、酵素及び保護剤の混合溶液を調製し、該溶液を支持体に適用し、該支持体を乾燥することにより、前記酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定することを含む前記の方法。
- (11) (1)ないし(7)の何れか一項に記載の支持体を液体に浸漬させることによ

り、該液体中に酵素を溶出させることを含む、支持体に固定された酵素を再生する方法。

(12) (5) ないし (7) の何れか一項に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させる工程と、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法。

【0008】

また、本発明は、酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態で保存する方法を提供する。

【0009】

さらに、本発明は、上記(7)に記載の支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼと、鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つとを溶出させる工程と、当該DNAポリメラーゼと鋳型となる核酸および/またはプライマーとを用いて核酸増幅反応を行うことを特徴とする、核酸の増幅方法を提供する。

【0010】

以下、本発明を詳細に説明する。

【0011】

本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を提供する。

【0012】

酵素は、何らかの触媒活性を有するものであればいかなるものであってもよく、例えば、DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼ、逆転写酵素、RNase、制限酵素、メチラーゼ、修飾酵素、ライゲース、プロテアーゼ、キナーゼ、フォスファターゼ、トランスフェラーゼ、グリコシラーゼ、トポイソメラーゼ、クロナーゼなどを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0013】

保護剤は、酵素を乾燥から保護し、安定に保存できるものであればいかなるものであってもよく、トレハロース及びその誘導体、多糖類、PEG、デキストラン、Ficoll、グリセロール、界面活性剤、PVA及びその誘導体などを例示することができる。このうち、トレハロース及びその誘導体が効果的である。

【0014】

保護剤は市販されているものであっても、公知の方法に従って合成したものであってもよい。

【0015】

トレハロースは、2分子のD-グルコースが1,1結合した非還元性二糖であり、結合様式としては、 $\alpha, \alpha$ -、 $\alpha, \beta$ -、 $\beta, \beta$ -の3種の異性体がある。

【0016】

トレハロースの誘導体としては、トレハロースの酸エステル（例えば、ラウリン酸エステル、オレイン酸エステル、リノール酸エステル、リノレン酸エステル、ステアリン酸エステル、パルミチン酸エステル、ミリスチン酸エステルなどの脂肪酸エステル、酢酸エステル、安息香酸エステルなどのカルボン酸エステル、硫酸エステルなど）、アルキルエーテル（例えば、炭素数8～25のアルキルとのエーテルなど）、ハライド、含窒素誘導体、含硫黄誘導体などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0017】

トレハロース及びその誘導体は市販されているが、公知の方法で製造してもよい。トレハロース及びその誘導体の製法は、シー・ケー・リー『デベロップメンツ・イン・フード・カルボハイドレート』、1980年、アプライッド・サイエンス・パブリッシャーズ社発行、第1乃至89頁やケー・ヨシモトラ『ケミカル・アンド・ファーマシューティカル・プレティン』、第30巻、第4号、第1,169乃至1,174頁（1982年）、特開平8-157491号などに記載されている。

【0018】

酵素1Uに対して、 $10^{-5} \sim 10^1$  M、好ましくは、 $10^{-4} \sim 10^{-1}$  Mの保護剤を

添加して混合するとよい。

【0019】

支持体は、酵素及び保護剤の混合物を固定できるものであればいかなるものであってもよく、例えば、紙（例えば、60MDP紙（三島製紙製）、コピー用紙、上質紙、中質紙、ケント紙、画用紙、クラフト紙、インクジェット専用紙、トレーシングペーパー、和紙、ボール紙、濾紙など）、ガラス基板、シリコン基板、ビース、カラム充填剤、シリカゲル、ニトロセルロース膜、ナイロン膜、PVA膜などを例示することができるが、これらに限定されることはない。

【0020】

支持体の厚さは、例えば、1mm以下とすることができる。この厚さを非常に薄くすれば（例えば0.1mm程度）、酵素及び保護剤を固定した支持体を多数枚積層して配布する場合にも、嵩張らないので、その作業性は向上する。

【0021】

支持体には、酵素及び保護剤の他、ポリヌクレオチド（例えば、DNA、RNA、それらの誘導体、修飾体など）、オリゴヌクレオチド（例えば、DNA、RNA、それらの誘導体、修飾体など）、タンパク質（例えば、抗体、ホルモンなど）、ポリペプチド、オリゴペプチド、多糖、オリゴ糖、PNA、低分子化合物（例えば、EDTA、PCR用バッファー組成に含まれる塩、 $Mg^{2+}$ 、dNTP混合物など）、それらの混合物などが固定されていてもよい。酵素及び保護剤以外の成分は、酵素及び保護剤の混合物と同じ位置で支持体上に固定されてもよいし、酵素及び保護剤とは異なる位置で支持体に固定されてもよい。特に、酵素に対するアプタマーが支持体に固定されているとよく、本発明は、酵素と当該酵素に対するアプタマーとが固定されている支持体も提供するものである。

【0022】

本発明の好ましい態様の一つにおいて、支持体は、DNAポリメラーゼと当該DNAポリメラーゼの保護剤の他、当該DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応で目的とする核酸を増幅するためのプライマーを含む。このような支持体は、genotypingや種の同定などに使用することができる。

【0023】

本発明の別の好ましい態様の一つにおいて、支持体は、DNAポリメラーゼと当該DNAポリメラーゼの保護剤の他、当該DNAポリメラーゼを用いた核酸増幅反応（PCRなど）の鋳型となる核酸、当該核酸を増幅するためのプライマー、及び核酸増幅反応のためのバッファーから選択される少なくとも一つを含む。

【0024】

例えば、DNAポリメラーゼを紙（支持体）に固定して保存する場合には、紙には、DNAポリメラーゼ及び保護剤の他、プライマーセット（オリゴヌクレオチド）、PCR反応の鋳型となるDNA（合成の1本鎖又は2本鎖DNAでもよいし、cDNAをクローニングしたベクターでもよい）、DNAポリメラーゼに対するアプタマー（機能性RNA）、PCR反応溶液中の各成分（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、dNTP混合物など）、EDTAなどを固定してもよい。この場合、（1）DNAポリメラーゼ、保護剤及びプライマーセットを1スポットとして、PCR反応の鋳型となるDNA、Tris-HCl及びEDTAを別のスポットとして紙に固定してもよいし、（2）DNAポリメラーゼ、保護剤及びプライマーセット、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマーを1スポットとして紙に固定してもよいし、（3）PCR反応に必要なすべての成分（すなわち、PCR反応の鋳型となるDNA、DNAポリメラーゼ、プライマーセット、Tris-HCl、KCl、MgCl、dNTP混合物など、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー）を保護剤とともに1スポットとして紙に固定してもよい。紙にDNAポリメラーゼなどの成分がスポットティングされていることがわかるように、スポットティングする成分に色素を添加しておくともよい。色素としては、クレゾールレッド、プロモフェノールブルー、キシレンシアノールなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

【0025】

支持体に固定する酵素の量は、目的とする酵素反応が行われるように適宜調整するとよい。例えば、PCR反応が行われるようにするためには、1スポット当たり5 ng以上のDNAポリメラーゼが固定されるとよい。

#### 【0026】

酵素及び当該酵素の保護剤の混合物が固定されている支持体は以下のようにして製造することができる。まず、酵素及び保護剤の混合溶液を調製する。酵素と保護剤の混合比は上記の通りである。溶媒は水であるとよい。さらに、この混合溶液に、酵素及び保護剤以外の上記の成分を添加してもよい。次いで、酵素及び保護剤の混合溶液を支持体に適用する。例えば、支持体が紙である場合には、スポイト、96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)、ディスプレイタイプのpin-toolなどを用いて、混合溶液を紙にスポッティングすることができる。その後、支持体を乾燥することにより、酵素及び保護剤の混合物を支持体に固定する。酵素及び保護剤の混合物を固定した支持体は実質的に水を含まないものであるとよい。

#### 【0027】

上記のように、酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態にすることによって、酵素を安定に保存することができる。保存条件としては、室温で、高湿度を避け、遮光下に保存することが好ましい。例えば、酵素がDNAポリメラーゼである場合、DNAポリメラーゼをトレハロースとの混合物として60MDP紙に固定した状態で室温で保存したとき、少なくとも6か月半の保存寿命が確認されている（現在、まだ保存試験は続行中である）。

#### 【0028】

上記のように、保護剤との混合物として支持体に固定した酵素を再生するには、酵素と保護剤との混合物を固定した支持体を液体に浸漬させ、該液体中に酵素を溶出させればよい。支持体を浸漬させる液体は、酵素の再生を可能とするものであればいかなるものであってもよいが、例えば、水、水以外の成分を含有する水溶液などを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。例えば、支持体に固定した酵素がDNAポリメラーゼである場合、支持体を浸漬させる液体は、水、PCR反応溶液（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、dNTP混合物などを含有する水溶液）などであるとよい。浸漬は、室温にて大気圧下で、1～3分間行えばよい。

#### 【0029】

支持体にDNAポリメラーゼが固定されている場合には、この支持体を液体中に配置して当該支持体よりDNAポリメラーゼを溶出させ、当該DNAポリメラーゼを用いて核酸増幅反応を行うことにより、核酸を増幅することができる。

#### 【0030】

また、本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を含む印刷物を提供する。

#### 【0031】

印刷物としては、教科書などの成書、ハンドブック、カタログ、定期刊行物、雑誌、論文、冊子、小冊子、リーフレット、パンフレット、報告書、ポスター、カード、ラベルなどを例示することができるが、これらに限定されるわけではない。

#### 【0032】

図1は、本発明の印刷物における、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポッティングされている紙（支持体）の一例を示す。紙6には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、PCR反応の鋳型となるcDNAクローン及びその他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー）とともにスポッティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」1という）。紙6には、DNA Spot 1の他に、cDNAクローンがコードするタンパク質の名前2（malate dehydrogenaseなど）、cDNAクローンの識別番号3（Clone ID）、cDNAクローンの塩基配列4（DNA sequence）、実験（PCR反応）の手順の説明文5（Procedures）が印刷されている。

## 【0033】

図2は、図1に示すDNA Spot 1を有する紙6を別紙として添付している学术论文12が掲載されている雑誌13を示す。

## 【0034】

図3は、図1に示すDNA Spot 1を有する紙6を綴じ込んだ書籍22を示す。この書籍には、さらに、目次が含まれているとよい。

## 【0035】

図4は、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポッティングされている紙（支持体）を綴じ込んだ書籍の別の態様を示す。酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポッティングされている頁34の各格子には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、PCR反応の鑄型となるcDNAクローン及びその他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー）とともに、スポッティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」31という。）。これらのスポット31を有する頁34には、スポットを識別するための記号（列番号）32及び（行番号）33が印刷されている。さらに、DNAをスポッティングした頁の識別番号30（Rearray PLATE ID）が印刷されている。スポッティングされているcDNAクローンに関する情報（例えば、cDNAクローンがコードする酵素のEC number、cDNAクローンがコードする酵素の名前（Gene name）、クローンのID番号（RIKEN Clone ID）、寄託番号（Accession Number）、cDNAクローンインサートの長さ（cDNA Insert）、PCR反応産物の長さ（After PCR）、cDNAクローンがコードする酵素が関与する反応の説明など）及びプライマーセットに関する情報（例えば、プライマーの塩基配列など）はCD-ROM36（CD-ROMの代わりにFD、MOなどの媒体でもよい）に記録されており、これらの記録媒体が書籍に付録として添付されている（図5）。図5においては、CD-ROM36は袋37に入れられ、シール38で封をした状態で書籍35に添付されている。この書籍には、さらに、目次、cDNAクローン及びプライマーセットを含むスポットの使用説明、記録媒体に記録されている情報へのアクセス方法が印刷されている頁が含まれているとよい。

## 【0036】

印刷物の形態としては、1）百科事典タイプの網羅的なもの（例えば、FANTOMクローン、ヒトメタボロームなど）、2）分野ごと（例えば、機能別或いは臓器別等）の分冊型、3）更にテーマというか内容を細分化した1ページから数ページのもの（例えば、ルーズリーフタイプ）、4）より少数の貼付物を想定したカードタイプを例示することができる。

## 【0037】

さらに、本発明は、酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体を含む試薬キットを提供する。

## 【0038】

本発明の試薬キットは、核酸増幅反応（例えば、PCR）キット、蛋白発生キット、抗体キット、その他のキットとして、種々の実験、検査、診断などに利用することができる。

## 【0039】

本発明の試薬キットは、上記のような印刷物の形態をとってもよいが、それ以外の形態の例を図6～9に示す。

## 【0040】

図6は、本発明の試薬キットにおける、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポッティングされている紙（支持体）の一例を示す。この紙には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、その他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー）とともに、紙の適当な位置にスポッティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」41という。）。



## 【0041】

図7は、図6に示すDNA Spot 4 1を有する紙4 2を含む試薬キットの一例を示す。DNA Spot 4 1を有する紙4 2は遮光ビン5 1に入れられ、蓋5 2で密栓をして保管あるいは流通される。試薬キットには、さらに、キットの内容（例えば、キットに含まれる成分・分量、使用目的、保管方法・有効期限、包装単位など）、使用方法、使用上及び取扱い上の注意、問合せ先などの情報が記載された説明書5 3を含むとよい。説明書5 3は遮光ビン5 1に入れてもよいし、遮光ビン5 1を入れた包装箱（図示せず）に入れてもよい。あるいは、説明書をラベルに印刷して、このラベルを遮光ビン5 1に貼り付けてもよい。

## 【0042】

図8は、本発明の試薬キットにおける、酵素（DNAポリメラーゼ）及びトレハロースの混合物がスポッティングされている紙（支持体）の一例を示す。この紙6 2には、DNAポリメラーゼ及びトレハロースが、プライマーセット、その他のPCR反応に必要な成分（すなわち、Tris-HCl、KCl、MgCl、各dNTP、必要により、DNAポリメラーゼに対するアプタマー）とともに、紙の適当な位置にスポッティングされている（以下、このスポットを「DNA Spot」6 1という）。

## 【0043】

図9は、DNA Spot 6 1を有する紙6 2を含む試薬キットの一例を示す。DNA Spot 6 1を有する紙6 2は包装パック7 1に入れられ、密封して保管あるいは流通される。試薬キットには、さらに、キットの内容（例えば、キットに含まれる成分・分量、使用目的、保管方法・有効期限、包装単位など）、使用方法、使用上及び取扱い上の注意、問合せ先などの情報が記載された説明書7 2を含むとよい。説明書7 2は包装パック7 1に入れてもよいし、包装パック7 1を入れた包装箱（図示せず）に入れてもよい。あるいは、説明書7 2をラベルに印刷して、このラベルを包装パック7 1又は包装箱に貼り付けてもよい。

## 【0044】

以上、DNAポリメラーゼをDNAと組み合わせた態様について、本発明を説明したが、本発明はこの態様に限定されるわけではなく、種々の酵素への適用が可能である。

なお、本明細書において、「～」はその前後に記載される数値をそれぞれ最小値および最大値として含む範囲を示す。

## 【発明の効果】

## 【0045】

本発明により、酵素を保存するための簡便な方法が提供された。

## 【発明を実施するための最良の形態】

## 【0046】

以下、本発明を実施例によって具体的に説明する。なお、これらの実施例は、本発明を説明するためのものであって、本発明の範囲を限定するものではない。

## 【実施例】

## 【0047】

## 【実施例1】

cDNAクローンとポリメラーゼをスポットしたDNAブック

## 《プライマーの合成》

下記配列のプライマーセットを従来法により合成した。

プライマーセット1

-21M13:5' -TGTAACGACGCGCCAGT-3'（配列番号1）

1233-Rv:5' -AGCGGATAACAATTTTCACACAGGA-3'（配列番号2）

## 【0048】

## 《cDNA溶液の調整》

理研クローン（<http://fantom.gsc.riken.go.jp/>）の中から下記の塩基配列で表されるマ

ウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA (クローンID: 1500012M15, 1758bp) をクローニングした pFLCベクター (図10) を0.1  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  となるようにTE (10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。

## 【0049】

マウスリンゴ酸脱水素酵素1500012M15

```
1  cccggttctc tcccagagtc tgttccgctg tagagggtgac ctgactgctg gagactgcct
61  tttgcagggtg cagagatcgg ccttgcaagt tgcaataatg tctgaaccaa tcagatgcct
121 tgtgactgga gcagctgggtc aaattgcata ttactgttg tacagtattg gaaatggatc
181 tgtctttggg aaagaccagc ccatcattct tgtgctgttg gacatcaccc ccatgatggg
241 tgttctggac ggtgtcctga tggaactgca agactgtgcc cttccccttc tgcaggatgt
301 cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacctg gatgtggctg tcctagtggg
361 ctccatgcca ataagggaag gcatggagag gaaggaccta ctgaaagcca atgtgaaaat
421 cttcaaatcc cagggcacag ccttgagaga atacgccaag aaatcagtta aggtcattgt
481 tgtgggaaac ccagccaata cgaactgcct gacagcctcc aagtcagcgc catcgatccc
541 caaggagaat ttcagttgcc tgactcgctt ggaccacaac cgagcaaaat ctcaaattgc
601 tcttaaacct ggtgtaaccg ctgatgatgt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc
661 atcgaccagc tatccagatg tcaatcatgc caaggtgaaa ctgcaaggaa aggaagtcgg
721 tgtgtatgaa gccctgaaag acgacagctg gctgaaggga gagttcatca cgactgtgca
781 acagcgtggt gctgctgtca tcaaggctcg gaagctgtcc agtgcaatgt ctgctgcgaa
841 agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttggaaac ccagagggag agttcgtgtc
901 gatgggtgtt atctctgatg gcaactccta tgggtgtccct gatgacctgc tctactcatt
961 ccctgtcgtg atcaagaata agacctggaa gtttgttgaa ggccctcccca ttaatgactt
1021 ctcccgtgaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgcttt
1081 tgagtttctc tcctctgctg gactagacac tcgttttgac atcagcagac agccgaaggc
1141 tgaggaatca aaatgtcgtc tttgagccta gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa
1201 ttgtgaacag caaaatattt taaatagtgt gtgctttatg atttgtgaaa gtctatcatg
1261 ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt
1321 ctactttata tttagtatct tcaggaaaac aagtttgccc aatagattat aattttactt
1381 ttttaattga ctaaaagaaa taaagatgga aaatattatg aagtaaagca ttagtctcta
1441 acataaaciaa ggaagcccaa tcaatttcag agggatccca ttacttaagt ccttaaagggt
1501 tggttcatgt tttgctcata atttgatttt aaaattagct gtaagaagggt tgcagataat
1561 ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtcatt aatatttgat agccaataat
1621 accacactat taatatttgt aagctaagat tattagaaac ataaaactgt ttttgagtca
1681 gtctgttttc catgagaaga catgcatcat ctttgtgtgt tttgtgcatt actcagtgc
1741 ataaataacc ataatctc (配列番号3)
```

## 【0050】

《ポリメラーゼ+プライマー溶液の調整》

Taq DNA polymerase (宝酒造製), トレハロース, プライマーセット1を混合し, 最終濃度25 U/ $\mu\text{l}$  Taq DNA polymerase、0.1 Mトレハロース, 2  $\mu\text{M}$ プライマーセット1となるように調整した。

## 【0051】

《DNAのスポットティング》

60MDP紙 (三島製紙製) に調整したcDNA溶液とポリメラーゼ+プライマー溶液を96 pin-to ol (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US) を用いて, 図11に示すように, スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。cDNA溶液は0.5  $\mu\text{l}$ /スポット, ポリメラーゼ+プライマー溶液は1  $\mu\text{l}$ /スポットとなるようにした。

## 【0052】

## 《DNAの回収と増幅》

スポットティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後、スポットしたcDNAおよびポリメラーゼ+プライマーを含むようにそれぞれ4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れた。PCR反応溶液 (10 mM Tris-HCl(pH8.3), 50 mM KCl, 5.3 mM MgCl, 200  $\mu$ M 各dNTP) 25  $\mu$ lをチューブに加え、次の条件でPCRを行った。

2 min at 94℃

(1 min at 94℃, 1 min at 55℃, 75sec at 68℃) 29サイクル

15 min at 74℃

## 【0053】

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図12に示す。1800bp付近に見られるバンドが目的とする断片と考えられ、60MDP紙からDNAが溶出し、そのDNAはPCRにより増幅可能であることが判った。

## 【0054】

## [実施例2]

# 黄体ホルモン遺伝子を使ったアプタマー+ポリメラーゼの実験

## 《プライマーの合成》

下記配列のプライマーを従来法により合成した。

プライマーセット1 (ヒト黄体形成ホルモン遺伝子エクソン1増幅するプライマーセット)

HsLH1F: CCAGGGGCTGCTGCTGTTG (配列番号4)

HsLH1R: CATGGTGGGGCAGTAGCC (配列番号5)

プライマーセット2 (ヒト黄体形成ホルモン遺伝子エクソン2増幅するプライマーセット)

HsLH2F: ATGCGCGTGCTGCAGGCG (配列番号6)

HsLH2R: TCGCGATTGAGAAGCCTTTATTG (配列番号7)

## 【0055】

## 《アプタマーの合成》

次に既知のTaq DNA polymeraseに対するアプタマー (Yun Lin, Sumedha D. Jayasena Inhibition of Multiple Thermostable DNA Polymerases by a Heterodimeric Aptamer Journal of Molecular Biology (1997), Vol. 27, Issue 1, pages 100-11) である下記配列を持つオリゴヌクレオチドを従来法により合成した。

GCCGGCCAATGTACAGTATTGGCCGGC (配列番号8)

## 【0056】

## 《プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ溶液の調整》

2種類のスポットティング用溶液を調整した。

上記のプライマーセット, Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, およびTaq DNA polymeraseを最終濃度, 2  $\mu$ Mプライマーセット, 2  $\mu$ M Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, 25 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase, 0.1 Mトレハロースとなるように混合, 調整したし

た溶液, およびこの組成よりTaq DNA polymeraseに対するアプタマーのみを除いた組成の溶液を調整した。

#### 【0057】

##### 《DNAのスポットティング》

60MDP紙(三島製紙製)に上記により調整したプライマー+アプタマー+ポリメラーゼ溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)を用いて, 図13に示すように, スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。スポットティング用溶液は1  $\mu$ l/スポットとなるようにした。

#### 【0058】

##### 《DNAの増幅》

スポットティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後, スポット部分を含むように4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れた。PCR反応溶液(10 mM Tris-HCl(pH8.3), 50 mM KCl, 5.3 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M 各dNTP) 25  $\mu$ lと50 ngテンプレートDNA(ヒトゲノムDNA, BD Biosciences Clontech, US社製)をチューブに加え, 次の条件でPCRを行った。

3min at 94°C

(30 sec at 94°C, 30 sec at 40°C, 30 sec at 72°C) 50サイクル

15 min at 72°C

#### 【0059】

反応後のチューブより適量を取り, 1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図14に示す。184bpおよび343bp付近に見られるバンドがそれぞれエクソン1および2の目的とするDNA断片と考えられ, 60MDP紙に固定されたプライマーを用いてテンプレートDNAからPCRにより目的とする断片を増幅可能であることが判った。また, Taq DNA polymeraseに対するアプタマーの有無を比較すると, アプタマーを含む反応の方が非特異的な増幅を抑えることが出来ることが判った。

#### 【0060】

##### [実施例3]

# 理研cDNAクローン+PCR溶液をスポットしたDNAブック

##### 《プライマーの合成》

下記配列のプライマーセットを従来法により合成した。

プライマーセット1

-21M13: 5' -TGTAACGACGGCCAGT-3' (配列番号1)

1233-Rv: 5' -AGCGGATAACAATTCACACAGGA-3' (配列番号2)

#### 【0061】

##### 《cDNA溶液の調整》

理研クローン (<http://fantom.gsc.riken.go.jp/>) の中から下記の塩基配列で表されるマウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA (クローンID: 1500012M15, 1758bp), マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP) (クローンID: 1500012E04, 2440bp), マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) (クローンID: E030024J03, 2160bp), マウスオキソグルタル酸脱水素酵素 (クローンID: E430020N12, 3554bp) をクローニングしたpFLCベクター (図10) を1  $\mu$ g/ $\mu$ l となるようにTE (10 mM Tris-HCl(pH8.0), 1 mM EDTA) に溶解した。

## 【0062】

マウスリンゴ酸脱水素酵素1500012M15

```

1 cccggttctc tccagagtc tgttccgctg tagaggtagc ctgactgctg gagactgcct
61 tttgcagggtg cagagatcgg ccttgcagtt tgcaataatg tctgaaccaa tcagagtcct
121 tgtgactgga gcagctgggtc aaattgcata ttcactgttg tacagtattg gaaatggatc
181 tgtctttggg aaagaccagc ccatcattct tgtgctgttg gacatcacc ccatgatggg
241 tgttctggac ggtgtcctga tggaaactgca agactgtgcc ctcccccttc tgcaggatgt
301 cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacctg gatgtggctg tcctagtggg
361 ctccatgcc aataagggaag gcatggagag gaaggacctt ctgaaagcca atgtgaaaat
421 ctcaaatacc cagggcacag ccttggagaa atacgccaag aaatcagtta aggtcattgt
481 tgtgggaaac ccagccaata cgaactgcct gacagcctcc aagtcagcgc catcgatccc
541 caaggagaat ttcagttgcc tgactcgctt ggaccacaac cgagcaaaaat ctcaaattgc
601 tcttaaaactc ggtgtaaccg ctgatgatgt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc
661 atcgaccag tatccagatg tcaatcatgc caagtgaaa ctgcaaggaa aggaagtcgg
721 tgtgtatgaa gccctgaaag acgacagctg gctgaaggga gattcatca cgactgtgca
781 acagcgtggt gctgctgtca tcaaggctcg gaagctgtcc agtgcaatgt ctgctgcgaa
841 agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttggaaac ccagagggag agttcgtgtc
901 gatgggtgtt atctctgatg gcaactccta tgggtgtccct gatgacctgc tctactcatt
961 ccctgtcgtg atcaagaata agacctggaa gtttgttgaa ggcctcccca ttaatgactt
1021 ctcccgtgaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgcttt
1081 tgagtttctc tcctctgctg gactagacac tcgttttgac atcagcagac agccgaaggc
1141 tgaggaatca aaatgtcgtc tttgagccta gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa
1201 ttgtgaacag caaaatattt taaatagtgt gtgctttatg atttgtgaaa gtctatcatg
1261 ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt
1321 ctactttata tttagtatct tcaggaaaac aagtttgccc aatagattat aattttactt
1381 ttttaattga ctaaaagaaa taaagatgga aaatattatg aagtaaagca ttagtctcta
1441 acataaaciaa ggaagcccaa tcaatttcag agggatccca ttacttaagt ccttaaagggt
1501 tggttcatgt tttgtccta atttgatttt aaaattagct gtaagaagggt tgcagataat
1561 ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtcatt aatatttgat agccaataat
1621 accacactat taatatttgt aagctaagat tattagaaac ataaaactgt ttttgagtca
1681 gtctgttttc catgagaaga catgcatcat ctttgtgtgt tttgtgcatt actcagtgc
1741 ataaataacc ataatctc (配列番号 3)

```

## 【0063】

マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP) 1500012E04

```

1 ggggtgttgc gctgtcgccg cggtagggga agtggacgag atggccgggt ccgctgtgggt
61 gtccaagggtc tctcggtgtc tgggtgcatt ccacaacaca aaacagggtga caagaggttt
121 tgctgggtgtt gttcagacag taactttaat tcctggagat ggaattggcc cagaaatttc
181 agcctcagtc atgaagattt ttgatgctgg ccaaagcacc tattcagtgg gaggagcgca
241 atgtcacagc aattcaagga ccaggaggaa agtgggatga tccctccaga agccaaggag
301 tccatggata agaacaagat gggcttgaaa ggccactaa agacccaat agccgtggc
361 catccatcta tgaatctgtt gcttcgtaag acatttgacc tttatgccaa tgcgggcca
421 tgtgtctcaa ttgaagggtt taaaaccctt tacacggatg taaatatcgt caccatccga
481 gagaacacgg aaggagaata cagtggaaat gagcatgtga tcgttgatgg ggttgtgcag
541 agcatcaagc icaicaccga agaagcaagc aagcgcatgt cagagtttgc cttcgagtac
601 gctcggaaac accaccggag caacgtcaca gctgtgcaca aagctaacat catgaggatg
661 tcagatgggc tctttctgca aaaatgcagg gaagttgcgg agaactgtaa agacattaaa
721 tttacagaga tgtaccttga tactgtatgt ttaaataatg tacaagacc atccagttt
781 gatgttcttg tcatgcaaaa tttatacgga gacatcctta gtgatctgtg tgcaggactg
841 attggagggtc ttggggtgac tccaagtggc aatattggag ccaacgggtg tgccatcttt

```

901 gaatcgggtc atggaacagc cccggacatt gcaggcaagg acatggccaa cccacggcc  
961 ctctgtctta gtgctgtgat gatgcttcgc cacatgggac tttttgacca tgcagcaaaa  
1021 atcgaggctg catgttttgc tacaattaag gatggaaaga gcttaacaaa agatctggga  
1081 ggcaacgcga agtgctctga cttcacagaa gaaatctgtc gtagagtcaa agacttagat  
1141 tagcactcct gctgggtgat ttgctgcagt cagtcaatca ctccaaaagg ataccctgta  
1201 atcctccttg agggcgccca ccattggttt gcttgcttct tgacagagta cgttttttga  
1261 atctggcctt ttcttaacaa aacccttgca atggatgcac atgatggccc caggccttca  
1321 ttcaaagggt ttcccaagt gctggttgta ttattgtcc gtctggtaaa ccttattttg  
1381 taaactgtaa gtgaactgta tcatttatca ttgttaaccc attttact tccaggcaaaa  
1441 tcattttcct caactgtaaa tattctgata cagaattaat aagagaagat atttaacttt  
1501 ttaacaaaag ccctggattt ttggtttatg aaaaacaaac tgggaataaa acagggtttc  
1561 aacaatcgca caagataaca ttattctaata actaatgggt acaaaaagaaa ttactggga  
1621 aagttcacag caaaaaactg gtatatttct taaaaatatg gaaataaagt atttgtccta  
1681 tacatgaatt actattaata aaaatgtaag ctccaagaaa tccataatga atgatgtaat  
1741 tttgttacta catcggtaat ccttgtcaag gccccggatg ctctctgtgt atttgattct  
1801 ttggttacct tgagattcac ttttggggg gaagagcttt cagataaggg agatcactcc  
1861 tctactagaca gatcgtcagc attgcgagct gtcagccatg agagccagcc actgcagatc  
1921 ccctcccacg tggccacact ccagccagtg ctgcaggtga ccctggaaag gcctggctgc  
1981 cccttgactt tccctaaagc aaccagtcac tgccttctgc cccagtagca cccattacag  
2041 acttaattgc cgagggtggag ctgactcagc ccacgctcat acaaatcagg ccaagcgggg  
2101 gcctgtgtta ccagctgctg accatcagggt tctgcccctc attcttccca cagcctctgc  
2161 tccacagcat gaacctagcc tttggccac accaaagcca agctgtcttc ccttagccct  
2221 tgcactagtt tgcaaaactc tggttttgca taatgtacct tgggtcccaag gggatttctt  
2281 aacaacagat gtcctgtct gggtcatttt tttaaagctt ttatttggac ttacaatctt  
2341 ctgtgtattt tactttaaaa ctgtgcttt ccctgtctca ctggattgtt ctggtagca  
2401 gtggcttttg gttcacagta ataaagaact taagaact (配列番号 9)

//

## 【0064】

マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) E030024J03

1 ggatctaact ggggccggct tattacagct tgtgtgtac gcggggtgtg agccgggtta  
61 ttgaagtaaa aatgtccaga aaaatccaag gaggttctgt ggtggagatg caaggagatg  
121 aaatgacacg aatcatttgg gaattgatta aggaaaaaact tattcttccc tatgtggaac  
181 tggatctgca tagctatgat ttaggcatag agaatcgtga tgccaccaat gaccagggtca  
241 ccaaagatgc tgcagaggct ataaagaaat acaacgtggg cgtcaagtgt gctaccatca  
301 ccccgatga gaagagggtt gaagaattca agttgaaaca aatgtggaaa tccccaaatg  
361 gcaccatccg aaacattctg ggtggcactg tcttcaggga agctattatc tgcaaaaata  
421 tccccgggt agtgacaggc tgggtaaaac ccatcatcat tggccgacat gcatatgggg  
481 accaatacag agcaactgat tttgttgtc ctgggcctgg aaaagtagag ataacctaca  
541 cacaaaaga tggaaactcag aagggtgacat acatggtaca tgactttgaa gaagggtgtg  
601 gtgttgccat gggcatgtac aaccaggata agtcaattga agactttgca cacagttcct  
661 tccaaatggc tctgtccaag ggctggcctt tgtatctcag caccaagaac actattctga  
721 agaagtatga tgggcgtttc aaagacatct tccaggagat ctatgacaag aaatacaagt  
781 cccagtttga agctcagaag atctgctatg aacacaggct catagatgac atgggtggccc  
841 aagctatgaa gtccgaggga ggcttcactt gggcctgtaa gaattacgat ggggatgtgc  
901 agtcagactc agtcgccccaa ggttatggct cccttggcat gatgaccagt gtgctgattt  
961 gtccagatgg taagacggta gaagcagagg ctgccatgg cactgtcaca cgtcactacc  
1021 gcatgtacca gaaagggcaa gagacgtcca ccaaccccat tgcttccatt tttgcctggt  
1081 cccgagggtt agccacaga gcaaagcttg ataacaatac tgagctcagc ttcttcgcaa  
1141 aggcttttga agacgtctgc attgagacca ttgaggctgg ctttatgact aaggacttgg

1201 ctgcttgcat taaaggctta cccaatgtac aacgttctga ctacttgaat acatttgagt  
1261 ttatggacaa acttggagaa aacttgaagg ccaaattagc tcaggcccaa actttaaggt  
1321 caaacctggg cttagaatga gtctttgagg taactaggct cacaggttta cgtatttttt  
1381 tttttttttt tagtaacact caagattaaa aacaaaaatc attttgaat tggtttagaa  
1441 gacaaagtig aacttttata tatgtttaca gtcttttttc ttttcatac agttattgcc  
1501 accttaatga atgtgggtggg gaaatttttt taattgtatt ttattgtgta gtagcagtgt  
1561 aggaattatg ttagtacctg ttcacaatta actgtcatgt tttctcatgc tctaattgtaa  
1621 atgacaaaaa tcagaagtgc tccaagggtg aacaatagct acagtatggt tccccataag  
1681 gggaaaagag aaactcactt cccctgttgt ccatgagtgt gaacactggg gcctttgtac  
1741 gcaaatgttg tactgtgtgt gggagagcta tacagtaagc tcacataaga ctggaacaga  
1801 taggatgtgt gtagctaaaa tgcattggcag acgtgtttat aaagagcatg tatgtgtcca  
1861 atatactagt tatattttta gaccactgga gaattccaag tctagaataa atgcagactg  
1921 gaggattctg ctctttgatt tctcttctcc tgtgaccag cctaagtatt atcctacccc  
1981 aagcagtaca tttcacccat gggcaataat gggagctgta ccgtttggat ttctgctgac  
2041 ctgctgcatt tcttttataa aaatgtgact tttttttccc agaagtgtat attaaacact  
2101 attcagctct agtccttcta aactgttaat ttttaattaaa atgaagtact aatgactctt  
(配列番号 10) //

## 【0065】

マウスオキソグルタル酸脱水素酵素E430020N12

1 ggggggtggag ctgaacggga gacaggtact tgtggaaggc ttcaggacaa aatgtttcat  
61 ttaaggactt gtgctgctaa gttaaggcca ttgacagcct ccagactgt taagacattt  
121 tcacaaaaca aaccagcagc aattaggacg tttcaacaga ttcggtgcta ttctgcacct  
181 gtagctgctg aaccatttct tagtgggact agttcgaact atgtggagga aatgtactgt  
241 gcctgggttg agaattccaa aagtgtacat aagtcattggg acattttttt ccgaaacacc  
301 aatgctggag cccaccggg cactgcctac cagagccccc tttccctgag tcgaagctcc  
361 ctggctacca tggcccatgc acagtccctg gtggaagcac aacctaacgt cgacaaactc  
421 gtggaggacc acttggcggg gcagctcttc atcagggcct atcagatacg agggcaccat  
481 gtagcacagc tggacccctt ggggattttg gatgctgac tggactcctc cgtgcccgtt  
541 gacattatct catccacaga caaacttggg ttctatggcc tacacgagtc tgaccttgac  
601 aaggtcttcc acttaccac caccatttc atcgggggac aggagccagc acttctctt  
661 cgggagatca tccgtcggct ggagatggcc tactgccagc acattggtgt ggagttcatg  
721 ttcattaatg atttgaaca atgccagtgg atccgacaga agtttgagac ccctggaatc  
781 atgcagttca ccaatgagga gaagcggacc ttgctggcca ggctgttacg atccaccagg  
841 tttagaggag tcctacagcg aaagtggctc tcggagaagc gttttggtct ggaaggctgt  
901 gaggtgctga tccctgccct caagacaatc attgatatgt caactcagat gaccctgaag  
961 ctgtcatgta tgtatgcaag gtggcagctg agtggagaaa caccttcac aaggatgttg  
1021 tagttgatct ggtgtgttat cgacgaaatg gccacaatga gatggacgaa cctatgttta  
1081 cacagccact catgtacaag cagatccgca agcagaagcc tgtactgcag aagtatgcag  
1141 aattgctagt ctcccagggt gtcgtcaatc agcctgagta cgaggaggaa atctccaagt  
1201 atgataagat ctgtgaggaa gcatttacca gatccaaaga tgagaagatc ttgcacatca  
1261 agcactggct ggattccccc tggcctggct ttttcacctt ggatggacag cccaggagca  
1321 tgacctgcc ctccactggc ctggaggagg atgtcttgtt ccacattgga aagggtggcca  
1381 gctctgtacc tgtggagaac ttactatcc atggagggtt gagccggatc ttgaagacct  
1441 gcagagagct tgtgacgaac cggactgttg actgggccct ggcagagtac atggcatttg  
1501 gctcactgct gaaggaaggc atccatgtgc ggctgagtgg ccaggatgtg gagcggggca  
1561 ccttcagcca tcgccaccat gtgctccatg atcagaatgt tgacaaaaga acctgcatcc  
1621 ccatgaacca cctttggcca aatcaggccc ctactactgt atgcaacagc tcgctgtctg  
1681 agtacggtgt cctgggcttt gagctgggct ttgccatggc tagcccta atgctgtgtt  
1741 tctgggaggc ccagtttggt gacttcaaca acatggcaca gtgcatcatt gaccagttca

1801 tctgccagg acaggcaaag tgggtgcggc agaattggcat tgtgctcctg ctgcctcatg  
1861 gcatggaagg catgggtccc gagcattcct ctgaccgccc agagcggttt ctgcataatg  
1921 gcaatgatga cccatatgtc ctgctgact tgcaggaaga actctttgac atcaatcagc  
1981 tatatgactg caactggatt gttgtcagct gttccaccg tggcaacttc ttccatgtgc  
2041 tgcgacaaca gatcttgctg cccttccgta agccgttaat agtcttctact cccaaatccc  
2101 tcttgcgcca cctgaggca agaactatct ttgacgatat gttgccagga acgcacttcc  
2161 agcgtgtgat cccagaaaat ggacatgcag ctgaggaccc tcacaaagtc aagagacttc  
2221 tcttctgcac tgggaagggtg tactatgacc tcaccgaga gcgcaaagcc aggaacatga  
2281 aggaggagggt ggctattaca aggatgagc agctatcacc attccccttt gacctcctgt  
2341 tgaaagaggc tcagaagtat cccaatgctg agctggcctg gtgccaggaa gagcacaaga  
2401 accaaggcta ctatgactat gtcaagccaa gacttcgtac caccattgac cgtgctaagc  
2461 ctgtctggta tgctgtccga gaccggcag ctgtccagc cactggcaac aagaaaacac  
2521 acctgacaga gctgcagcgc tttctggaca cagcctttga cctggacgca ttcaagaaat  
2581 tctcttagat gctcctggag ttgatgaggc catggccccc atgtccatga cgctctttgc  
2641 ttctcaacta aagaatagtg cctcagcact gtccacacgt cccttcgctg tgccacacca  
2701 cccctgttct cataggaatt aagtgtcca ctgcagtgtc cagctgtcc cgggtcacat  
2761 gctgcccagc ctgtgccgac ttctctcagg ctgcacaccg ttcatggaga ccggaaggag  
2821 cagaataagg aaagggtccc tctcaggaca tcctagagaa ggaaggcagc tctggcccca  
2881 cccatgcccc cagtgaatc ctccagggtg ggaacagaac cctatgtggc ttcccagggt  
2941 actagcactc agccctcgtc acccatcaag tcgcagattc aaggccagga gtagtttcat  
3001 cttgctaggg ccaagctgag agctcatgga ggaactatag ctgccaggat ttgggagtca  
3061 tcaggatgtt gtgtgaatag agattgtcat ggggtattta gaggacttta gcagtgtgt  
3121 tagtctagcc ctgtaccct tcttgggtt gggctgtatg tgggaaactt accccagcta  
3181 ccacgcctgg agagcttggc tctgagtacg gcccagaagc tccattggct cccaacgcca  
3241 ggcaactgtg cctcttggc ctgtgcctc tgctctcctg accctcccc agtcacttca  
3301 ttttctctgt tgttccctt aacacacaga agctgttgac gaattcttt ttttctgtg  
3361 ccaaggcagg tcaaaagcag atcagtggat aagagcaagt tgtccaagg agccagctgt  
3421 ccttcctccc tcttttgacc tccactggga cacacctgat ttatttatt tggttaaaaa  
3481 aaaaaaggaa atgaaaaaag aacaaccacc ttgcattgc atcggttga cccataaact  
3541 aagttatcat ggct (配列番号 11)  
//

#### 【0066】

《cDNA+プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ+PCR用バッファー組成溶液の調整》  
上記cDNA, プライマーセット1, Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, およびTaq DNA polymeraseを最終濃度, 5  $\mu$ Mプライマーセット1, 5  $\mu$ M Taq DNA polymeraseに対するアプタマー, 50 U/ $\mu$ l Taq DNA polymerase, 0.1 Mトレハロース, 250 mM Tris-HCl(pH 8.3), 1.25 M KCl, 132.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 5  $\mu$ M 各dNTPとなるように調整した。

#### 【0067】

《DNAのスポットティング》  
60MDP紙(三島製紙製)に上記により調整した溶液を96 pin-tool (Multi 96-multiblot replicator VP409, Bio Medical Science Inc., US)を用いて, 図15に示すように, スポットの位置および種類が判別できるようにスポットした。スポットティング用溶液は1  $\mu$ l/スポットとなるようにした。

#### 【0068】

《DNAの増幅》  
スポットティングした用紙を30分以上室温にて乾燥させた後, スポット部分を含むように4 mm x 4 mm の大きさに60MDP紙を切り取りPCR用マイクロチューブに入れ, そこに水25  $\mu$ l



を加え、次の条件でPCRを行った。

2 min at 94℃  
(1 min at 94℃, 1 min at 55℃, 75sec at 68℃) 29サイクル  
15 min at 74℃

#### 【0069】

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図16に示す。Lane 1はリンゴ酸脱水素酵素のcDNA、Lane 2はイソクエンサン脱水素酵素 (NADP) のcDNA、Lane 3はイソクエンサン脱水素酵素 (NAD) のcDNA、Lane 4はオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNA、左端はサイズマーカーを示す。4種類のcDNAについてそれぞれ目的とする長さの断片が得られ、60MDP紙に固定したcDNA、プライマー、アプタマー、ポリメラーゼ、およびPCR用バッファー組成物に水のみを加えることによりPCR増幅が可能であることが判った。

#### 【0070】

反応後のチューブより適量を取り、1%アガロースゲルで電気泳動した結果を図108に示す。184bpおよび343bp付近に見られるバンドがそれぞれエクソン1および2の目的とするDNA断片と考えられ、60MDP紙に固定されたプライマーを用いてテンプレートDNAからPCRにより目的とする断片を増幅可能であることが判った。また、Taq DNA polymeraseに対するアプタマーの有無を比較すると、アプタマーを含む反応の方が非特異的な増幅を抑えることが出来ることが判った。

#### 【産業上の利用可能性】

##### 【0071】

本発明の支持体は、酵素の保存や流通に利用することができる。また、印刷物及び試薬キットへの応用も可能である。

#### 【図面の簡単な説明】

##### 【0072】

【図1】 DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポッティングされている紙 (支持体) の一例を示す。

【図2】 DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポッティングされた紙が別紙として添付された学术论文が掲載されている雑誌を示す。

【図3】 DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポッティングされた紙を綴じ込んだ書籍の一例を示す。

【図4】 DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポッティングされている紙 (支持体) を綴じ込んだ書籍の別の態様を示す。

【図5】 図4の紙にスポッティングされているcDNAに関する情報が記録されているCD-ROMが袋に入れられ、シールで封をした状態で書籍に添付されている形態を示す。

【図6】 DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポッティングされている紙 (支持体) の一例を示す。

【図7】 図6の紙を含む試薬キットの一例を示す。

【図8】 DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポッティングされている紙 (支持体) の一例を示す。

【図9】 図8の紙を含む試薬キットの一例を示す。

【図10】 マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNAをクローニングしたpFLCベクターの構成を示す。

【図 1 1】マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNA溶液のスポット及びポリメラーゼ+プライマー溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

【図 1 2】図 1 1 のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

【図 1 3】プライマー+アプタマー+ポリメラーゼ溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

【図 1 4】図 1 3 のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

【図 1 5】マウスリンゴ酸脱水素酵素、マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP)、マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) 又はマウスオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNA + プライマー + アプタマー + ポリメラーゼ + PCR 用バッファー組成溶液のスポットを有する60MDP紙を示す。

【図 1 6】図 1 5 のスポットを用いて行ったPCR反応の反応生成物を電気泳動した結果を示す。

【符号の説明】

【0073】

- 1 : DNA Spots
- 2 : cDNAクローンがコードするタンパク質 (malate dehydrogenaseなどの酵素) の名前
- 3 : cDNAクローンの識別番号
- 4 : cDNAクローンの塩基配列
- 5 : 実験の手順の説明文
- 6 : DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポットティングされている紙
- 12 : 学術論文
- 13 : 雑誌
- 22 : 書籍
- 30 : DNAがスポットティングされている頁の識別番号
- 31 : DNA Spots
- 32 : スポットを認識するための記号 1 (列番号)
- 33 : スポットを認識するための記号 2 (行番号)
- 34 : DNAポリメラーゼ及びトレハロースの混合物がDNA (cDNA、プライマー、アプタマーなど) とともにスポットティングされている頁
- 35 : 書籍
- 36 : CD-ROM
- 37 : 袋
- 38 : シール
- 41 : DNA Spot
- 42 : 紙 (支持体)
- 51 : 遮光ピン
- 52 : 蓋
- 53 : 説明書
- 61 : DNA Spots
- 62 : 紙 (支持体)
- 71 : 包装パック
- 72 : 説明書

【配列表フリーテキスト】

【0074】

配列番号 1 は、プライマー-21M13の塩基配列を示す。

配列番号 2 は、プライマー1233-Rvの塩基配列を示す。

配列番号 3 は、マウスリンゴ酸脱水素酵素のcDNAの塩基配列を示す。  
配列番号 4 は、プライマーHsLH1Fの塩基配列を示す。  
配列番号 5 は、プライマーHsLH1Rの塩基配列を示す。  
配列番号 6 は、プライマーHsLH2Fの塩基配列を示す。  
配列番号 7 は、プライマーHsLH2Rの塩基配列を示す。  
配列番号 8 は、Taq DNA polymeraseに対するアプタマーの塩基配列を示す。  
配列番号 9 は、マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NADP) のcDNAの塩基配列を示す。  
配列番号 10 は、マウスイソクエン酸脱水素酵素 (NAD) のcDNAの塩基配列を示す。  
配列番号 11 は、マウスオキソグルタル酸脱水素酵素のcDNAの塩基配列を示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

<110> The Institute of Physical and Chemical Research  
Kabushiki Kaisha DNAFORM

<120> Enzyme-fixing supports, printed materials, reagent  
kits, a method for preparing the support, a method for  
storing an enzyme and a method for renaturing an enzyme

<130> P03-054

<140>

<141>

<160> 11

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 18

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 1

tgtaaaacga cggccagt

18

<210> 2

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 2

agcggataac aatttcacac agga

24

<210> 3

<211> 1758

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 3

cccggttctc tcccagagtc tggtccgctg tagaggtagc ctgactgctg gagactgcct 60

```

tttgcagggtg cagagatcgg ccttgcagtt tgcaataatg tctgaaccaa tcagagtcct 120
tgtgactgga gcagctggtc aaattgcata ttcactgttg tacagtattg gaaatggatc 180
tgtctttggg aaagaccagc ccatcattct tgtgctgttg gacatcaccc ccatgatggg 240
tgttctggac ggtgtcctga tggaaactga agactgtgcc cttccccttc tgcaggatgt 300
cattgcaacg gacaaagaag agattgcctt caaagacctg gatgtggctg tcctagtggg 360
ctccatgcca ataaggggaag gcatggagag gaaggacctt ctgaaagcca atgtgaaaat 420
cttcaaattc cagggcacag ccttggagaa atacgccaag aaatcagtta aggtcattgt 480
tgtgggaaac ccagccaata cgaactgcct gacagcctcc aagtcagcgc catcgatccc 540
caaggagaat ttcagttgcc tgactcgctt ggaccacaac cgagcaaaat ctcaaattgc 600
tcttaaactc ggtgtaaccg ctgatgatgt aaagaatgtc attatctggg gaaatcattc 660
atcgaccagc tatccagatg tcaatcatgc caaggtgaaa ctgcaaggaa aggaagtcgg 720
tgtgtatgaa gccctgaaag acgacagctg gctgaaggga gagtcatca cgactgtgca 780
acagcgtggt gctgctgtca tcaaggctcg gaagctgtcc agtgcaatgt ctgctgcgaa 840
agccatcgca gaccacatca gagacatctg gtttggaaac ccagagggag agttcgtgtc 900
gatgggtgtt atctctgatg gcaactccta tgggtgtcct gatgacctgc tctactcatt 960
ccctgtcgtg atcaagaata agacctggaa gtttgttgaa ggccctccca ttaatgactt 1020
ctcccgtaaa aagatggacc tgacagcaaa ggagctgacc gaggaaaagg agaccgcttt 1080
tgagtttctc tcctctgctg gactagacac tcgttttgac atcagcagac agccgaaggc 1140
tgaggaatca aaatgtcgtc tttgagccta gtaccaaaca gtaataatgc tacattcaaa 1200
ttgtgaacag caaaatattt taaatagtgt gtgctttatg atttgtgaaa gtctatcatg 1260
ttgttagtgc tgcaatctaa ataaaagtat attcaagtga aaatctctca gactctgttt 1320
ctactttata tttagtatct tcaggaaaac aagtttgccc aatagattat aattttactt 1380
ttttaattga ctaaaagaaa taaagatgga aaatattatg aagtaaagca ttagtctcta 1440
acataaacia ggaagcccaa tcaatttcag agggatccca ttacttaagt ccttaaagg 1500
tggttcatgt tttgctcata atttgatttt aaaattagct gtaagaagg 1560
ctatcttctt tatattctat agcagaataa tgaagtcatt aatatttgat agccaataat 1620
accacactat taatatttgt aagctaagat tattagaaac ataaaactgt ttttgagtca 1680
gtctgttttc catgagaaga catgcatcat ctttgtgtgt tttgtgcatt actcagtga 1740
ataaataacc ataattctc 1758

```

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

&lt;400&gt; 4

ccaggggctg ctgctgttg

19

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 18

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial Sequence

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 5  
catggtgggg cagtagcc 18

<210> 6  
<211> 18  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 6  
atgcgcgtgc tgcaggcg 18

<210> 7  
<211> 23  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 7  
tgcggattga gaagccttta ttg 23

<210> 8  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> Artificial Sequence

<220>  
<223> Description of Artificial Sequence: synthetic DNA

<400> 8  
gccggccaat gtacagtatt ggccggc 27

<210> 9  
<211> 2438  
<212> DNA  
<213> Mus musculus

<400> 9  
gggtgttgcc gctgtcgccg cggtagggga agtggacgcg atggccgggt ccgcgtgggt 60  
gtccaaggctc tctcggctgc tgggtgcatt ccacaacaca aaacagggtga caagaggttt 120  
tgctggtggt gttcagacag taactttaat tcctggagat ggaattggcc cagaaatttc 180

```

agcctcagtc atgaagattt ttgatgctgg ccaaagcacc tattcagtgg gaggagcgca 240
atgtcacagc aattcaagga ccaggaggaa agtgggatga tccctccaga agccaaggag 300
tccatggata agaacaagat gggcttgaaa ggcccactaa agaccccaat agccgctggc 360
catccatcta tgaatctgtt gcttcgtaag acatttgacc tttatgcaa tgtccggcca 420
tgtgtctcaa ttgaaggtta taaaaccctt tacacggatg taaatatcgt caccatccga 480
gagaacacgg aaggagaata cagtgggaatt gagcatgtga tcgttgatgg ggttgtgcag 540
agcatcaagc tcatcaccga agaagcaagc aagcgcattg cagagtittg cttcgagtac 600
gctcgggaaca accaccggag caacgtcaca gctgtgcaca aagctaacat catgaggatg 660
tcagatgggc tctttctgca aaaatgcagg gaagtgtcgg agaactgtaa agacattaaa 720
tttaacgaga tgtaccttga tactgtatgt ttaaataatg tacaagacc atcccagttt 780
gatgttcttg tcatgccaaa ttatcacgga gacatcctta gtgatctgtg tgcaggactg 840
attggaggtc ttggggtgac tccaagtggc aatattggag ccaacggtgt tgccatcttt 900
gaatcggttc atggaacagc cccggacatt gcaggcaagg acatggccaa cccacggcc 960
ctcctgctta gtgctgtgat gatgcttcgc cacatgggac tttttgacca tgcagcaaaa 1020
atcgaggctg catgttttgc tacaattaag gatggaaaga gcttaacaaa agatctggga 1080
ggcaacgcga agtgctctga cttcacagaa gaaatctgtc gtagagtcaa agacttagat 1140
tagcactcct gctggtggat ttgctgcagt cagtcaatca ctccaaaagg ataccctgta 1200
atcctccttg agggcgccca ccattggttt gcttgcttct tgacagagta cgttttttga 1260
atctggcctt ttcttaacaa aacccttgca atggatgcac atgatggccc caggccttca 1320
ttcaaaggtt tttcccaagt gctggttgta tttattgtcc gtctggtaaa cttatatttg 1380
taaactgtaa gtgaactgta tcatttatca ttgttaaccc attttacact tcaggcaaaa 1440
tcattttcct caactgtaaa tattctgata cagaattaat aagagaagat atttaacttt 1500
ttaacaaaag ccctggattt ttggtttatg aaaaacaaac tgggaataaa acagggtttc 1560
aacaatcgca caagataaca ttattctaata actaatgggt acaaaaagaaa tttactggga 1620
aagttcacag caaaaaactg gtatatttct taaaaatatg gaaataaagt atttgtccta 1680
tacatgaatt actattaata aaaatgtaag ctccaagaaa tccataatga atgatgtaat 1740
tttgttacta catcggtaat ctttgtcaag gccccggatg ctctctgtgt atttgattct 1800
ttggttacct tgagattcac tatttggggg gaagagcttt cagataaggg agatcactcc 1860
tcactagaca gatcgtcagc attgcgagct gtcagccatg agagccagcc actgcagatc 1920
ccctcccacg tggccacact ccagccagtg ctgcaggatg ccctggaaag gcctggctgc 1980
cccttgactt tccctaaagc aaccagtcac tgccttctgc ccagtagca cccattacag 2040
acttaattgc cgagggtggag ctgactcagc ccacgctcat acaaatcagg ccaagcgggg 2100
gcctgtgtta ccagctgctg accatcaggt tctgccccctc attcttccca cagcctctgc 2160
tccacagcat gaacctagcc tttggcccac accaaagcca agctgtcttc ccttagccct 2220
tgactagtt tgcaaacctg tggctttgca taatgtaccc tgggtcccaag gggatttctt 2280
aacaacagat gtccctgtct gggtcatttt tttaaagctt ttatttggac ttacaatctt 2340
ctgtgtattt tactttaaaa ctgctgcttt ccctgtctca ctggattgtt ctggtttagca 2400
gtggctttgg gttcacagta ataaagaact taagaact 2438

```

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 2160

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 10

```

ggatctaact ggggccggct tattacagct tgttgtgtacg cgcgggtgtg agccgggtta 60
ttgaagtaaa aatgtccaga aaaatccaag gaggttctgt ggtggagatg caaggagatg 120
aatgacacg aatcatttgg gaattgatta aggaaaaact tattcttccc tatgtggaac 180
tggatctgca tagctatgat ttaggcatag agaatcgtga tgccaccaat gaccaggtca 240

```

```

ccaaagatgc tgcagaggct ataaagaaat acaacgtggg cgtcaagtgt gctaccatca 300
ccccgatga gaagagggtt gaagaattca agttgaaaca aatgtggaaa tccccaaatg 360
gcaccatccg aaacattctg ggtggcactg tcttcaggga agctattatc tgcaaaaata 420
tccccggct agtgacaggc tgggtaaaac ccatcatcat tggccgacat gcatatgggg 480
accaatacag agcaactgat tttgtgttc ctgggcctgg aaaagtagag ataacctaca 540
caccaaaaga tggaaactcag aaggtgacat acatggtaca tgactttgaa gaaggtggtg 600
gtgttgccat gggcatgtac aaccaggata agtcaattga agactttgca cacagttcct 660
tccaaatggc tctgtccaag ggctggcctt tgtatctcag caccaagaac actattctga 720
agaagtatga tgggcgtttc aaagacatct tccaggagat ctatgacaag aaatacaagt 780
cccagtttga agctcagaag atctgctatg aacacaggct catagatgac atgggtggccc 840
aagctatgaa gtccgaggga ggcttcatct gggcctgtaa gaattacgat ggggatgtgc 900
agtcagactc agtcgccccaa ggttatggct cccttggcat gatgaccagt gtgctgattt 960
gtccagatgg taagacggta gaagcagagg ctgccatgg cactgtcaca cgtcactacc 1020
gcatgtacca gaaagggcaa gagacgtcca ccaaccccat tgcttccatt tttgcctggt 1080
cccgagggtt agcccacaga gcaaagcttg ataacaatac tgagctcagc ttcttcgcaa 1140
aggcttttga agacgtctgc attgagacca ttgaggctgg ctttatgact aaggacttgg 1200
ctgcttgcac taaaggctta cccaatgtac aacgttctga ctacttgaat acatttgagt 1260
ttatggacaa acttggagaa aacttgaagg ccaaattagc tcaggcccaa actttaaggt 1320
caaacctggg cttagaatga gtctttgcgg taactaggct cacaggttta cgtatttttt 1380
tttttttttt tagtaacact caagattaaa aacaaaaatc attttgaat tggtttagaa 1440
gacaaagtgt aacttttata tatgtttaca gtcttttttc ttttccatac agttattgcc 1500
accttaatga atgtggtggg gaaatttttt taattgtatt ttattgtgta gtagcagtgt 1560
aggaattatg ttagtacctg ttcacaatta actgtcatgt tttctcatgc tctaattgaa 1620
atgacaaaa tcagaagtgc tccaagggtg aacaatagct acagtatggt tcccataag 1680
gggaaaagag aaactcactt cccctgttgt ccatgagtgt gaacactggg gcctttgtac 1740
gcaaatgttg tactgtgtgt gggagagcta tacagtaagc tcacataaga ctggaacaga 1800
taggatgtgt gtagctaaaa tgcattggcag acgtgtttat aaagagcatg tatgtgtcca 1860
atatactagt tataattttta gaccactgga gaattccaag tctagaataa atgcagactg 1920
gaggattctg ctcttttgatt tctcttctcc tgtgaccag cctaagtatt atcctacccc 1980
aagcagtaca tttcacccat gggcaataat gggagctgta ccgtttggat ttctgctgac 2040
ctgctgcatt tcttttataa aaatgtgact tttttttccc agaagttgat attaaacact 2100
attccagtct agtccttcta aactgttaat tttaattaaa atgaagtact aatgactctt 2160

```

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 3554

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Mus musculus

&lt;400&gt; 11

```

gggggtggag ctgaacggga gacaggctact tgtggaaggc ttcaggacaa aatgtttcat 60
ttaaggactt gtgctgctaa gttaaggcca ttgacagcct cccagactgt taagacattt 120
tcacaaaaca aaccagcagc aattaggacg tttcaacaga ttcggtgcta ttctgcacct 180
gtagctgctg aaccatttct tagtgggact agttcgaact atgtggagga aatgtactgt 240
gcctggtttg agaatcccaa aagtgtacat aagtcatggg acattttttt ccgaaacacc 300
aatgctggag cccacccggg cactgcctac cagagccccc tttccctgag tcgaagctcc 360
ctggctacca tggcccatgc acagtccctg gtggaagcac aacctaacgt cgacaaactc 420
gtggaggacc acttggcggg gcagtctctc atcagggcac atcagatacg agggcaccat 480
gtagcacagc tggacccccct ggggattttg gatgctgac tggactcctc cgtgcccgtc 540
gacattatct catccacaga caaacttggg ttctatggcc tacacgagtc tgaccttgac 600

```



aaggtcttcc acttaccac caccactttc atcgggggac aggagccagc acttcctctt 660  
cgggagatca tccgtcggct ggagatggcc tactgccagc acattgggtg ggagtcatg 720  
ttcattaatg atttgaaca atgccagtgg atccgacaga agtttgagac ccctggaatc 780  
atgcagttca ccaatgagga gaagcggacc ttgctggcca ggcttgtacg atccaccagg 840  
tttgaggagt tcctacagcg aaagtgggtc tcggagaagc gttttgggtc ggaaggctgt 900  
gaggtgctga tccctgccct caagacaatc attgatatgt caactcagat gaccctgaag 960  
ctgtcatgta tgtatgcaag gtggcagctg agtggagaaa caccttccac aaggatgttg 1020  
tagttgatct ggtgtgttat cgacgaaatg gccacaatga gatggacgaa cctatgttta 1080  
cacagccact catgtacaag cagatccgca agcagaagcc tgtactgcag aagtatgcag 1140  
aattgctagt ctcccagggt gtcgtcaatc agcctgagta cgaggaggaa atctccaagt 1200  
atgataagat ctgtgaggaa gcatttacca gatccaaaga tgagaagatc ttgcacatca 1260  
agcactggct ggattcccc tggcctggct ttttaccct ggatggacag cccaggagca 1320  
tgacctgccc ctccactggc ctggaggagg atgtcttgtt ccacattgga aaggtggcca 1380  
gctctgtacc tgtggagaac ttactatcc atggagggtg gagccggatc ttgaagacc 1440  
gcagagagct tgtgacgaac cggactgtgg actgggccct ggcagagtac atggcatttg 1500  
gctcactgct gaaggaaggc atccatgtgc ggctgagtgg ccaggatgtg gagcggggca 1560  
ccttcagcca tcgccaccat gtgctccatg atcagaatgt tgacaaaaga acctgcatcc 1620  
ccatgaacca ctttggcca aatcaggccc cttacactgt atgcaacagc tcgctgtctg 1680  
agtacggtgt cctgggcttt gagctgggtt ttgcatggc tagcccta at gctctgggtt 1740  
tctgggaggc ccagtttggg gacttcaaca acatggcaca gtgcatcatt gaccagttca 1800  
tctgcccagg acaggcaaa tgggtgcggc agaatggcat tgtgtcctg ctgcctcatg 1860  
gcatggaagg catgggtccc gagcattcct ctgaccgccc agagcgggtt ctgcatatgt 1920  
gcaatgatga cccatagtgc ctgctgact tgcaggaaga actctttgac atcaatcagc 1980  
tatatgactg caactggatt gttgtcagct gttccaccg tggcaacttc ttccatgtgc 2040  
tgcgacaaca gatcttgctg cccttccgta agccgtta at agtcttact cccaaatccc 2100  
tcttgcccca ccgtgaggca agaactatct ttgacgatat gttgccagga acgcacttcc 2160  
agcgtgtgat cccagaaaat ggacatgcag ctccaggacc tcacaaagtc aagagacttc 2220  
tcttctgcac tgggaagggt tactatgacc tcaccgaga gcgcaaagcc aggaacatga 2280  
aggaggagggt ggctattaca aggattgagc agctatcacc attccccctt gacctcctgt 2340  
tgaaagaggc tcagaagtat cccaatgctg agctggcctg gtgccaggaa gagcacaaga 2400  
accaaggcta ctatgactat gtcaagccaa gacttcgtac caccattgac cgtgctaagc 2460  
ctgtctggta tgctgtccga gaccggcgag ctgctccagc cactggcaac aagaaaacac 2520  
acctgacaga gctgcagcgc tttctggaca cagccttga cctggacgca ttcaagaaat 2580  
tctcttagat gctcctggag ttgatgaggc catggcccc atgtccatga cgctcttgc 2640  
ttctcaacta aagaatagt cctcagcact gtccacagct cccttcgctg tgccacacca 2700  
cccctgttct cataggaatt aagttgtcca ctgcagtgt cagctgtcct ccggtcacat 2760  
gctgcccagc ctgtgccgac ttctctcagg ctgcacaccg ttcatggaga ccggaaggag 2820  
cagaataagg aaagggtccc tctcaggaca tctagagaa ggaaggcagc tctggcccca 2880  
cccatgcccc cagtgaatc ctccagggtg ggaacagaac cctatgtggc ttcccagggt 2940  
actagcactc agccctcgtc acccatcaag tcgcagattc aaggccaggga gtagtttcat 3000  
cttgctaggg ccaagctgag agctcatgga ggaactatag ctgccaggat ttgggagtca 3060  
tcaggatgtt gtgtgaatag agattgtcat ggggtattta gaggacttta gcagtgatgt 3120  
tagtctagcc ctgctaccct tcttgggttt gggctgtatg tgggaaactt accccagcta 3180  
ccacgcctgg agagcttggc tctgagtacg gccagaagc tccattggct cccaacgcca 3240  
ggcactgctg cctcttggtc ctgctgcctc tgctctcctg accccicccc agtcacttca 3300  
ttttctctgt tgttcccttg aacacacaga agctgttgac gaattctttt ttttgctgtg 3360  
ccaaggcagg tcaaaagcag atcagtggat aagagcaagt tgtccaagg agccagctgt 3420  
ccttctctcc tcttttgacc tccactggga cacacctgat ttatttattt tggttaaaaa 3480  
aaaaaaggaa atgaaaaaag aacaaccacc tttgcatgtc atcggcttga cccataaact 3540  
aagttatcat ggtc 3554




【書類名】 図面

【図 1】

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase	2	6
Clone ID: 1500012M15	3	
DNA sequence		
.....		4
.....		
.....		
.....		
.....		
Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD)		
Clone ID: 1500012E04		
DNA sequence		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		
Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)		
Clone ID: E030024J03		
DNA sequence		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		
Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)		
Clone ID: E430020N12		
DNA sequence		
.....		
.....		
.....		
.....		
.....		

**Procedures**  
To amplify cDNA inserts, cut out the 4 mm X 4 mm area spotted with DNA, place it into a PCR tube, add 25  $\mu$  of water, centrifuge the resulting solution, and then initiate PCR cycle. The spot contains Taq DNA polymerase, an aptamer against the Taq DNA polymerase, trehalose, a PCR buffer, PCR primers (-21M13: 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3', 1233-Rv:5'-AGCGGATAACAATTTCACACAGGA-3'), each of dATP, dGTP, dCTP and dTTP, and MgCl<sub>2</sub>. After centrifuging the resulting solution, the PCR cycle is initiated. PCR cycles comprise 2 min at 94°C, 29 cycles of denaturing (94°C, 1 min), annealing (60°C, 1 min) and extension (68°C, 75 sec), and 15 min at 74°C.

Clone 1 

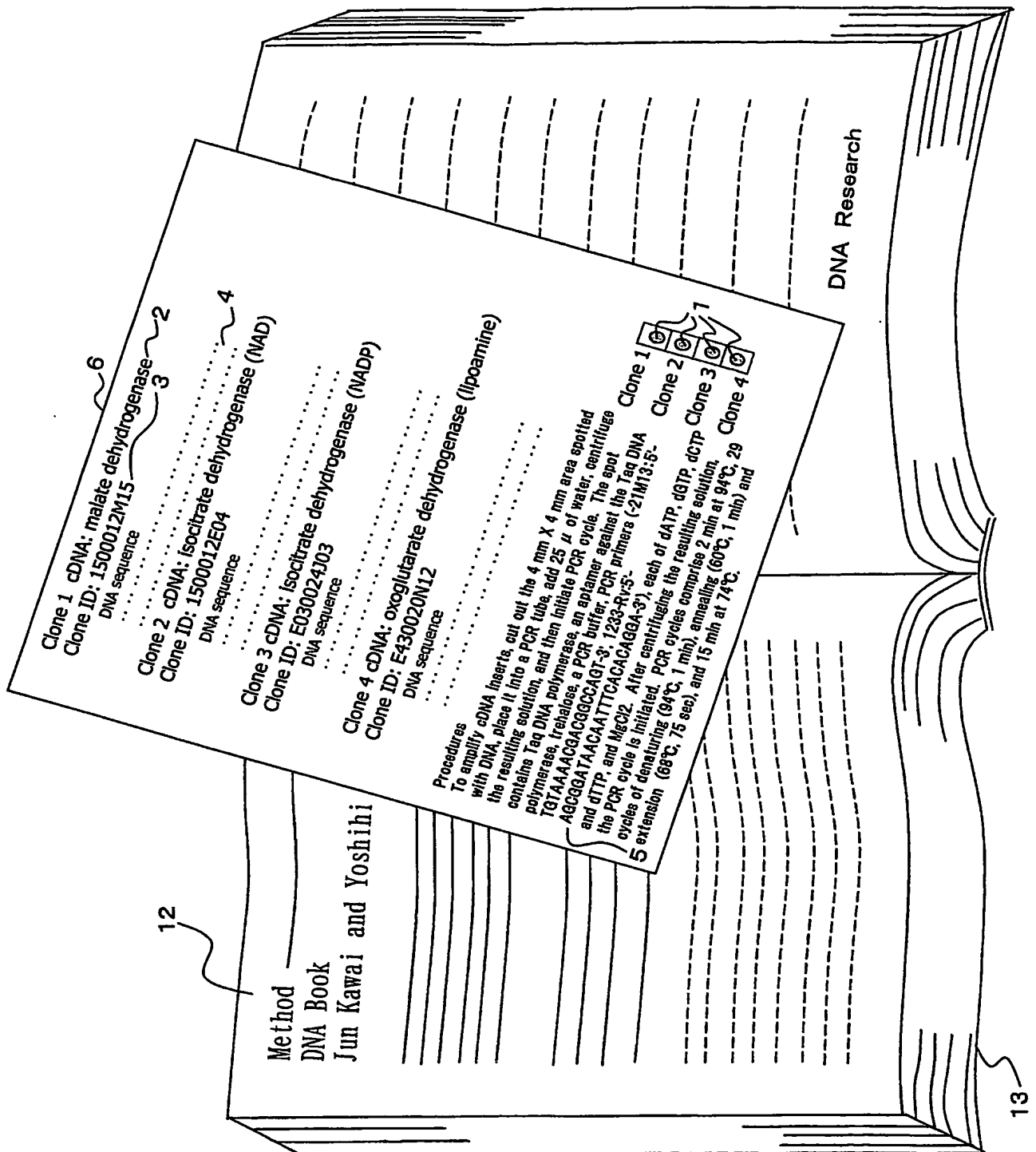
Clone 2

Clone 3

Clone 4

5

【図 2】



Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase ~ 6  
Clone ID: 1500012M15  
DNA sequence .....

Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase ~ 3  
Clone ID: 1500012E04  
DNA sequence .....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD) ~ 4  
Clone ID: E030024J03  
DNA sequence .....

Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase ~ 5  
Clone ID: E430020N12  
DNA sequence .....

## Procedures

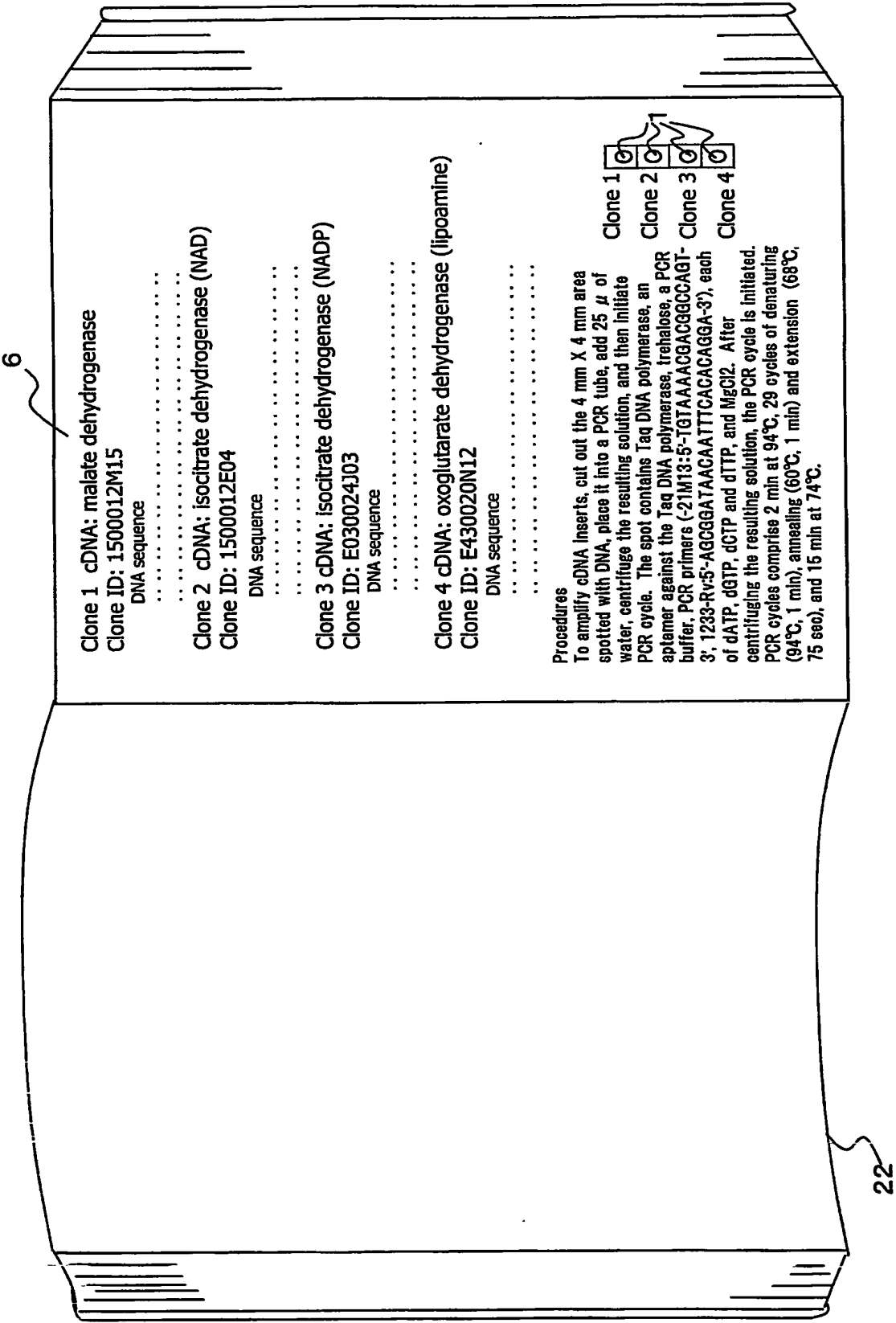
**Procedures**  
To amplify cDNA inserts, cut out the 4 mm X 4 mm area spotted with DNA, place it into a PCR tube, add 25  $\mu$ l of water, centrifuge the resulting solution, and then initiate PCR cycle. The spot contains Taq DNA polymerase, an aptamer against the Taq DNA polymerase, trehalose, a PCR buffer, PCR primers (21M13:5'-TGTAATAACGACGGCAGT-3', 1233-R:5'-AGCGGATATACAAATTCACACAGGA-3') and dATP, dGTP, dCTP, dTTP. After centrifuging the resulting solution, the PCR cycle is initiated. PCR cycles comprise 2 min at 94°C, 1 min at 60°C, 1 min, annealing (60°C, 1 min) and 5 cycles of denaturing (94°C, 1 min), extension (68°C, 1 min) and 5 extension (68°C, 15 sec), and 15 min at 74°C.

## Method

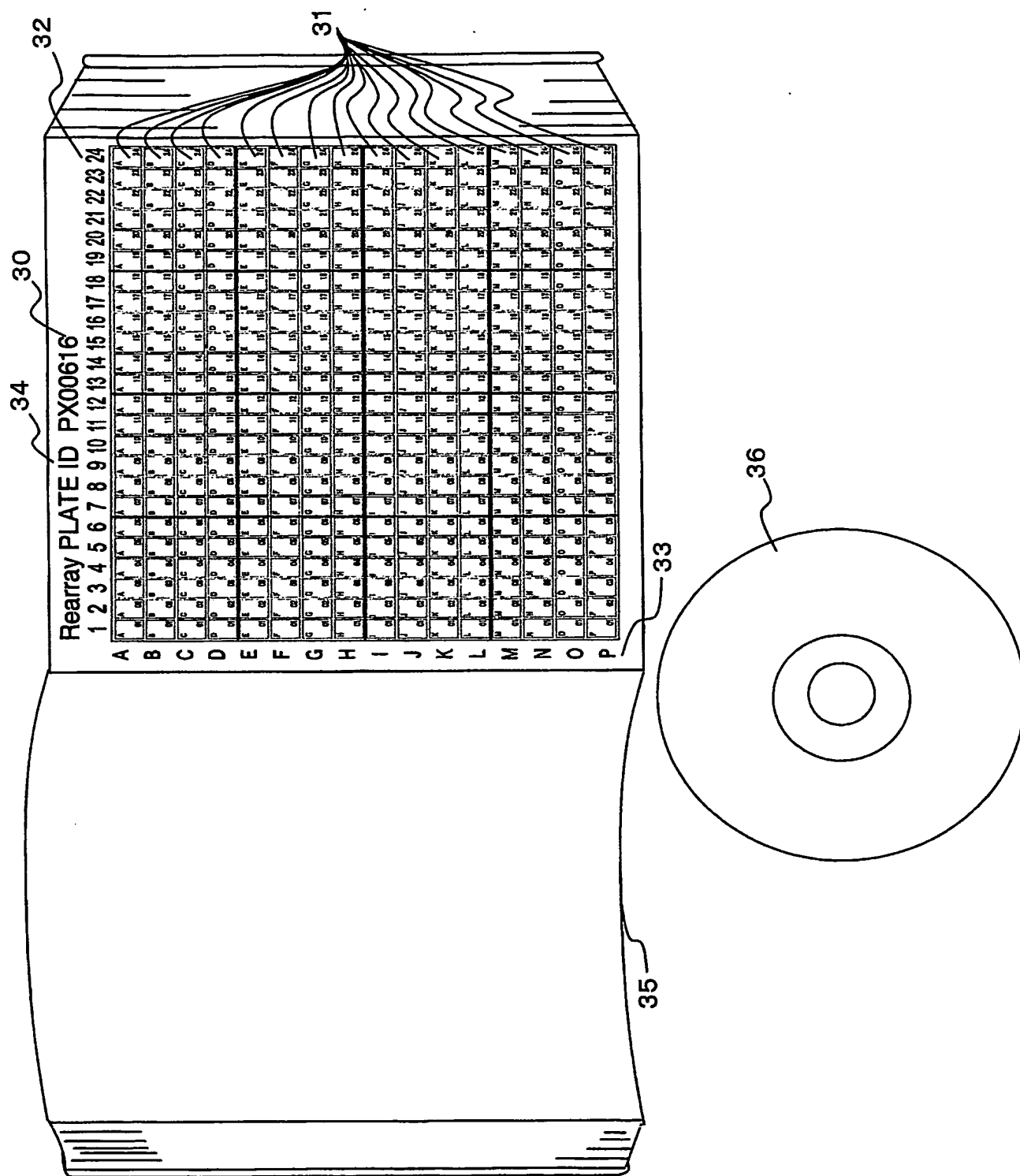
DNA Book

Jun Kawai and Yoshihi

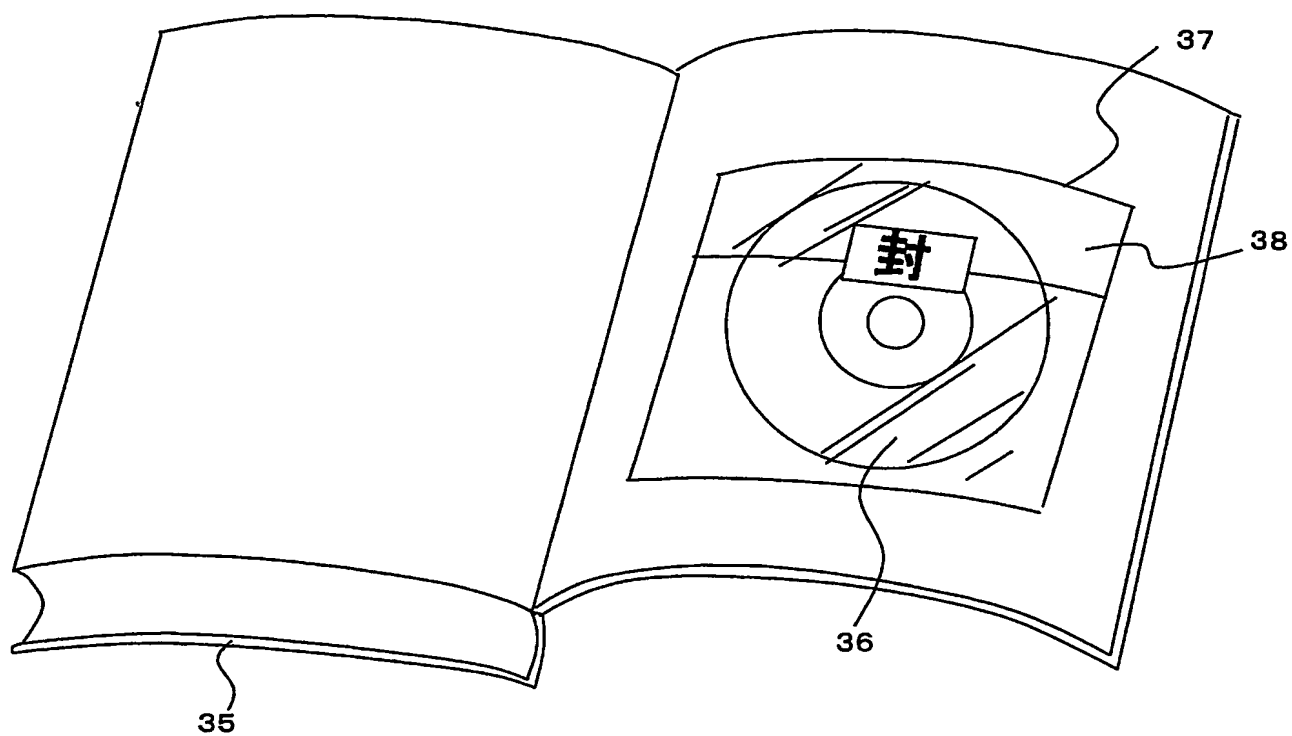
【図 3】



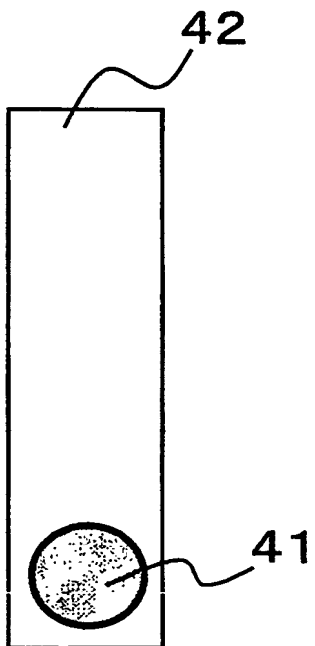
【図 4】



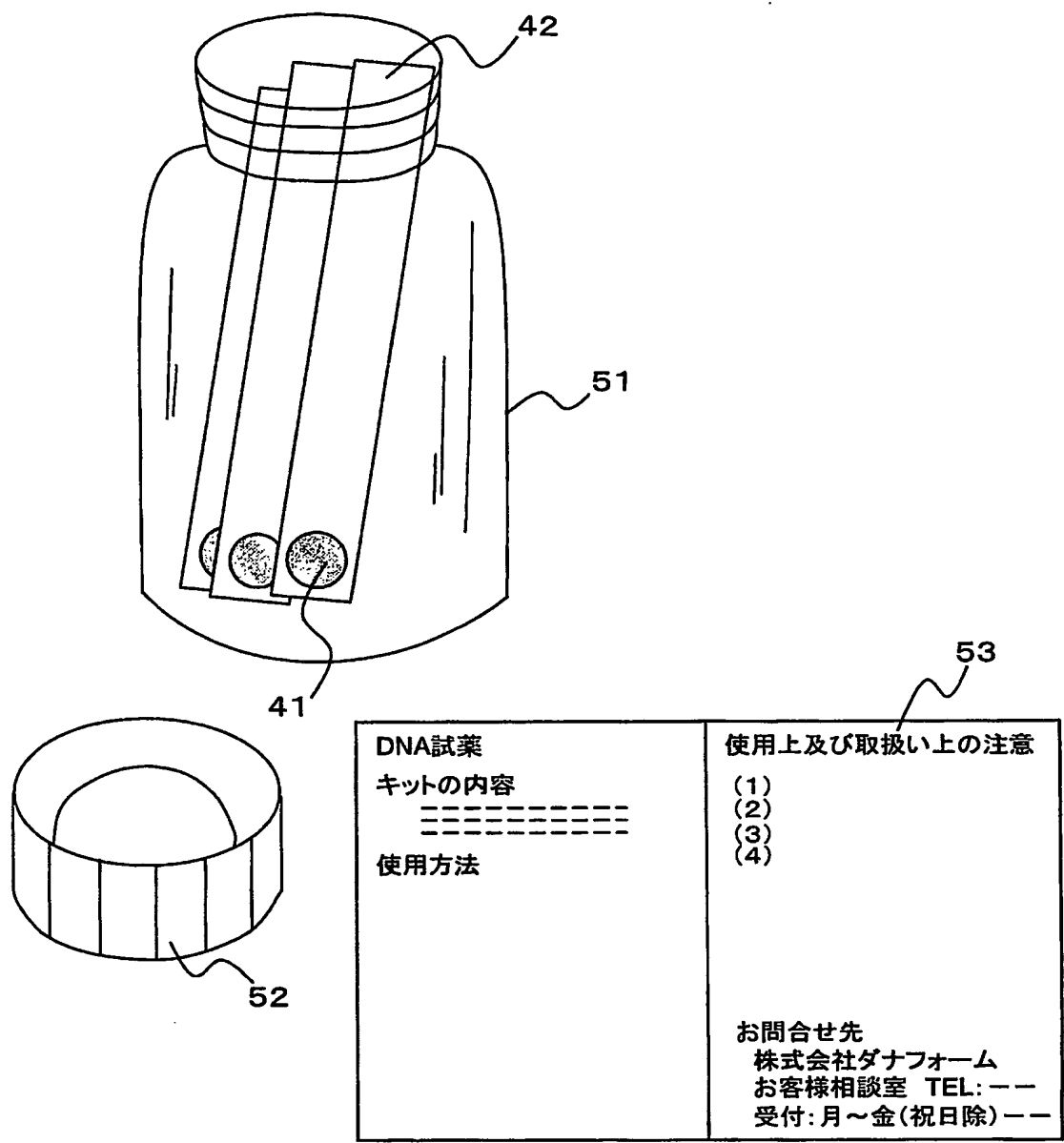
【図 5】



【図 6】

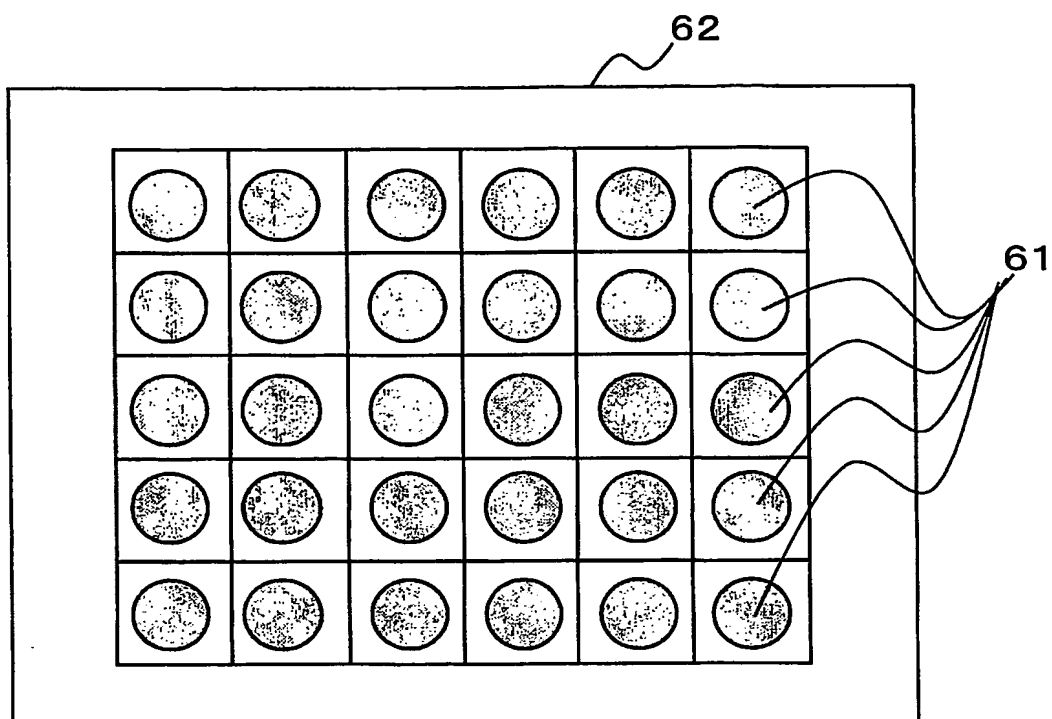


【図 7】

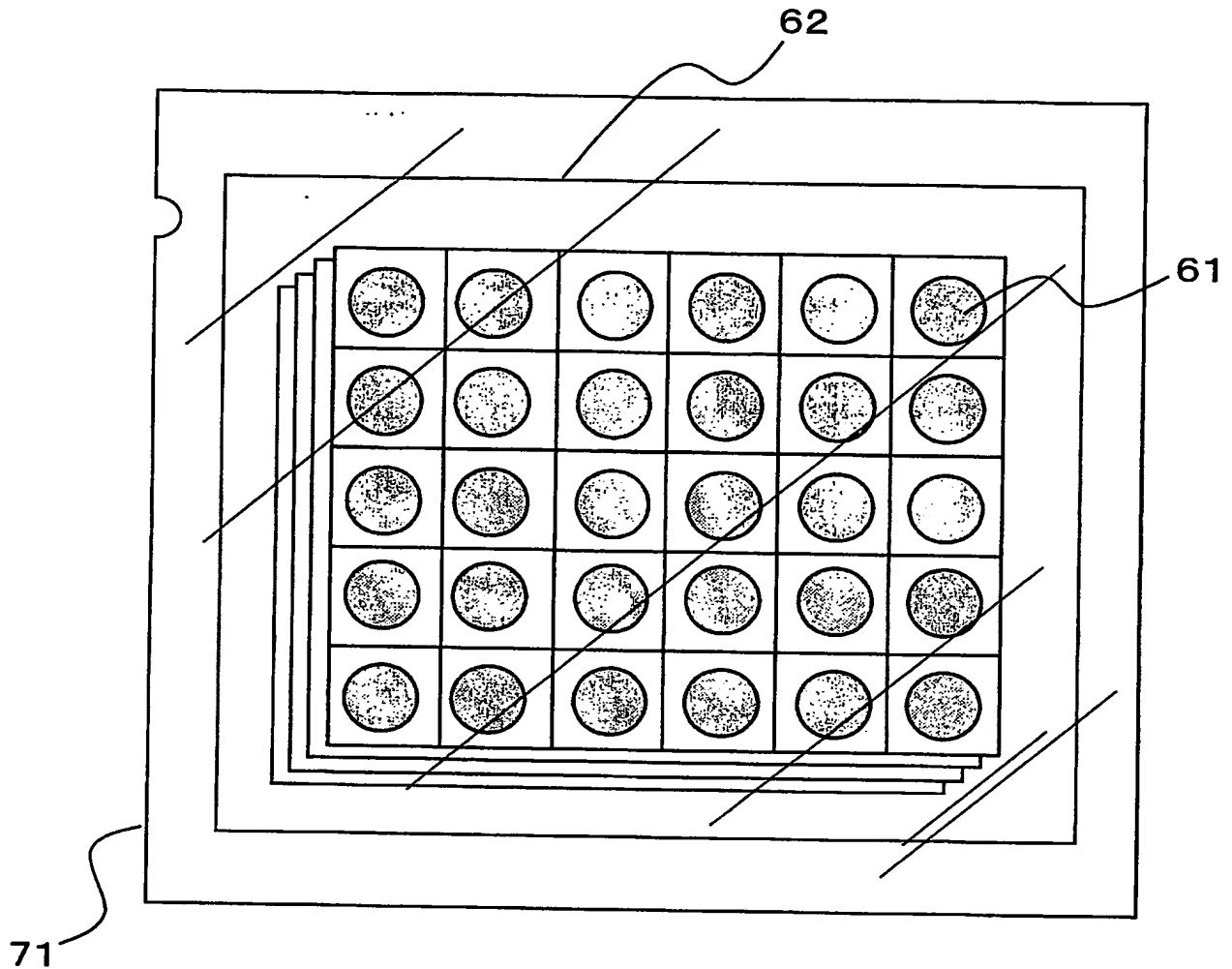




【図 8】

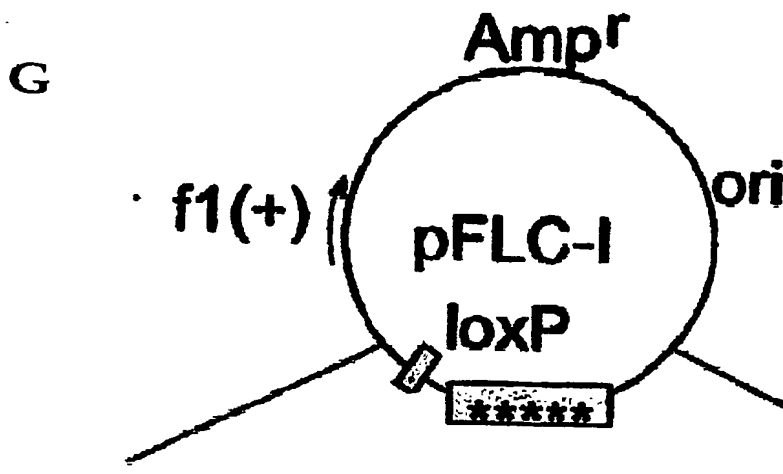


【図 9】



<p><b>DNA試薬</b></p> <p><b>キットの内容</b></p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p><b>使用方法</b></p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p> <p>-----</p>	<p><b>使用上及び取扱い上の注意</b></p> <p>(1) -----</p> <p>(2) -----</p> <p>(3) -----</p> <p>(4) -----</p> <p><b>お問合せ先</b></p> <p>株式会社ダナフォーム</p> <p>お客様相談室 TEL: --</p> <p>受付: 月～金(祝日除) --</p>
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

【図 10】



Fwd T7 loxP Sfi | Sal | \*\*\*\*\* Bam HI Sfi | T3 Rev  
TGTAACGACGGCCAGTGAATTGT AATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGC  
TCCAACGCGGTGGCGGCCGCATAACTTCGTATAGCATAATTATACGAAGTTATG  
GATCAGGCCAAATCGGCCGAGCTCGAATTCGTCGAC\*\*\*\*\*  
 \*\*\*\*\*  
GGATCCGGCCATAAGGGCC TGATCCTTCGAGGGGGGGCCCGGTACCAGCTTTTGT  
TCCCTTAGTGAGGGTTAATTTCGAGCTTGGCGTAATCATGGTCATAGCTGTTTC  
CTGTGTGAAATTGTT

【図 1 1】

**cDNA: malate dehydrogenase**  
**Clone ID: 1500012M15**

## DNA sequence

### Amino acid sequence

[illegible]

## Primer

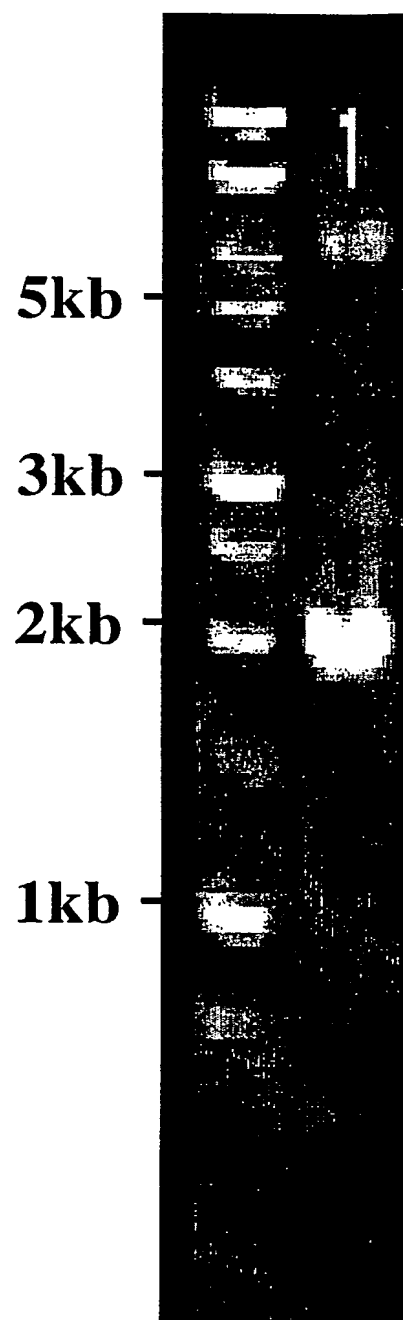
—21M13 : 5'-TGTAACGACGGCCAGT-3'

1233-Rv : 5'-AGCGGATAACAATTTACACAGGA-3'

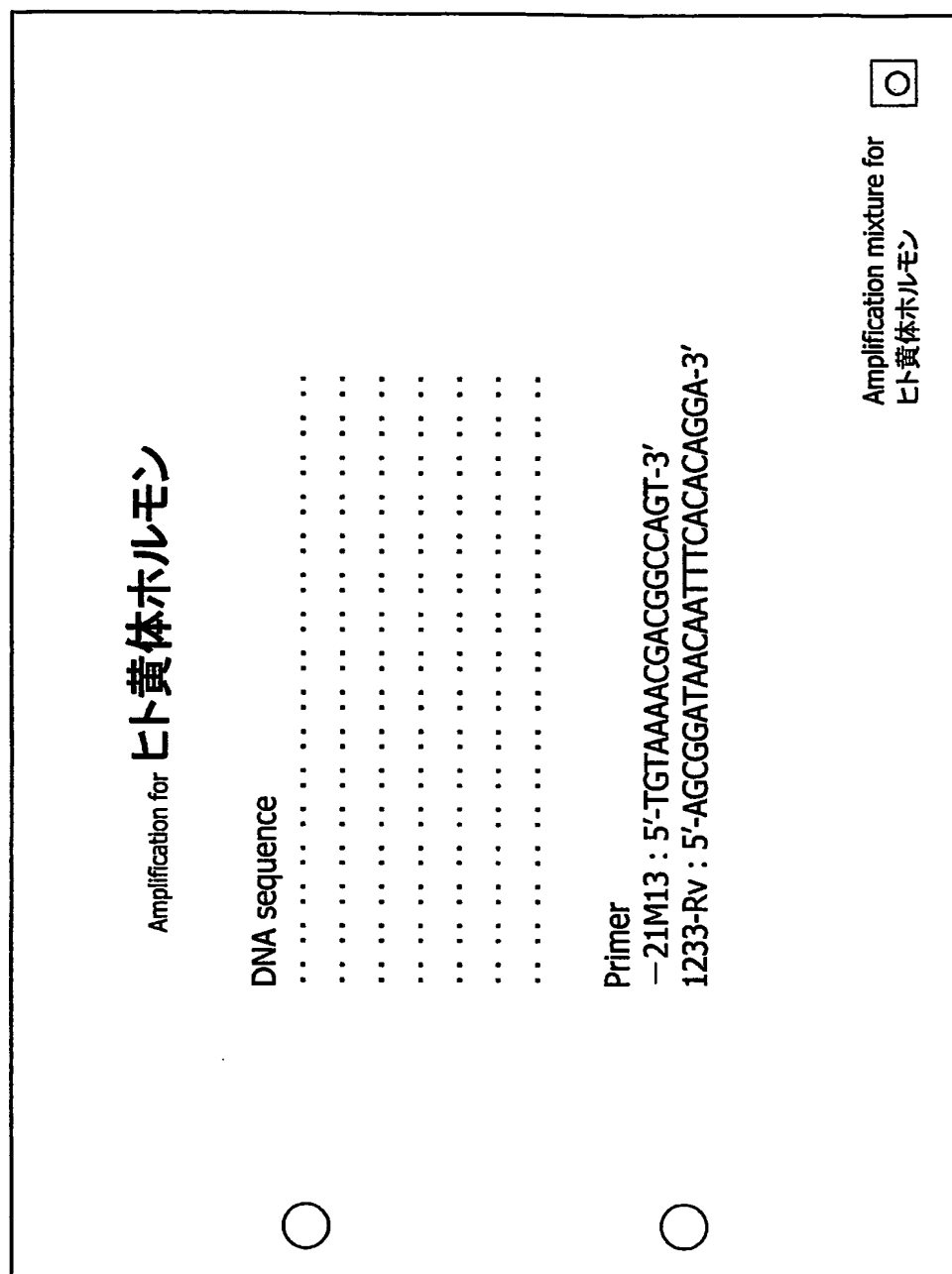
malate dehydrogenase cDNA  
primers



【図 12】



【図 13】



【図 1 4】

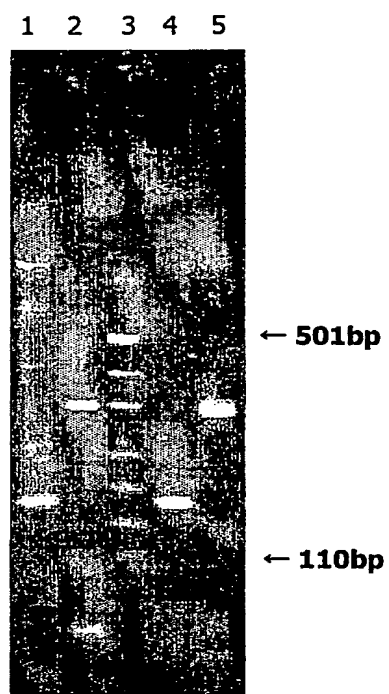
Lane 1: primer set 1, aptamer (-)

Lane 2: primer set 2, aptamer (-)

Lane 3: size marker

Lane 4: primer set 1, aptamer(+)

Lane 5: primer set 2, aptamer(+)



【図 15】

Clone 1 cDNA: malate dehydrogenase  
Clone ID: 1500012M15

DNA sequence

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 2 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NAD)  
Clone ID: 1500012E04

DNA sequence

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 3 cDNA: isocitrate dehydrogenase (NADP)  
Clone ID: E030024J03





DNA sequence

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 4 cDNA: oxoglutarate dehydrogenase (lipoamine)  
Clone ID: E430020N12

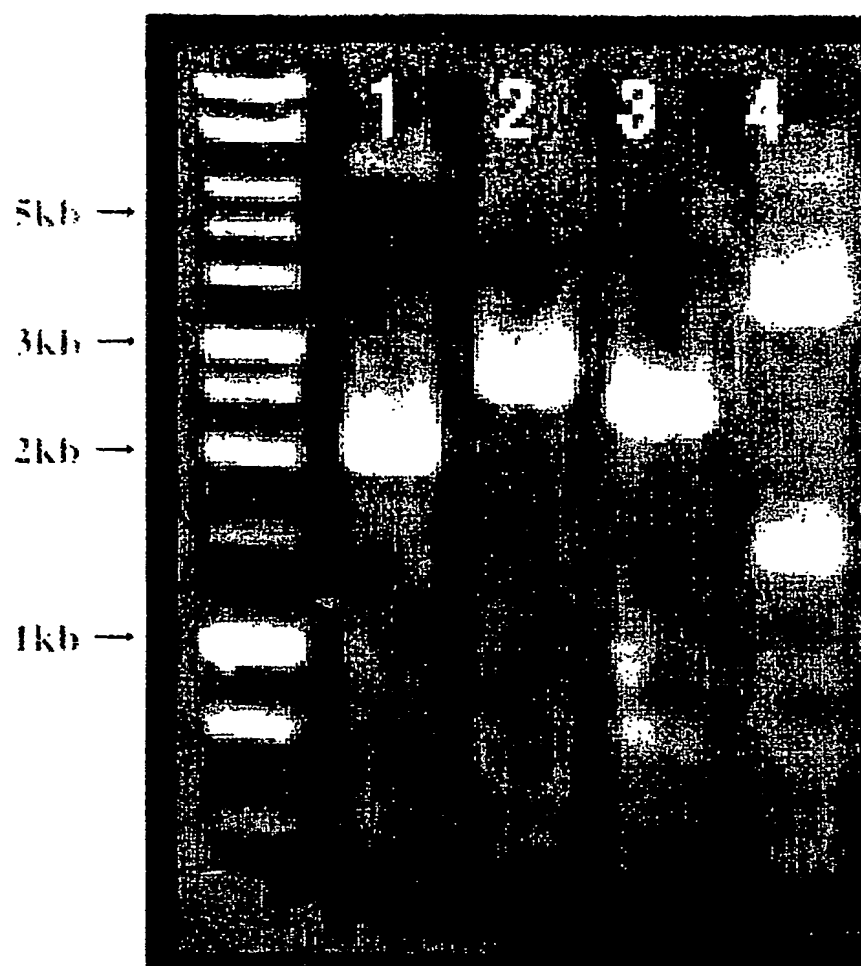
DNA sequence

.....  
.....  
.....  
.....  
.....

Clone 1	
Clone 2	
Clone 3	
Clone 4	



【図 16】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 酵素を保存するための簡便な方法を提供すること。

【解決手段】 酵素と当該酵素の保護剤とが固定されている支持体。該支持体を含む印刷物及び試薬キット。該支持体を製造する方法。該支持体に固定された酵素を再生する方法。酵素を保護剤との混合物として支持体に固定した状態で保存する方法。

【選択図】 図 1

【書類名】 出願人名義変更届 (一般承継)  
【提出日】 平成15年12月 1日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【事件の表示】  
【出願番号】 特願2003-339542  
【承継人】  
【識別番号】 503359821  
【住所又は居所】 埼玉県和光市広沢 2 番 1 号  
【氏名又は名称】 独立行政法人理化学研究所  
【承継人代理人】  
【識別番号】 100075812  
【弁理士】  
【氏名又は名称】 吉武 賢次  
【提出物件の目録】  
【物件名】 権利の承継を証明する書面 1  
【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件  
にかか一般承継による特許権の移転登録申請書  
【物件名】 登記簿謄本 1  
【援用の表示】 平成15年11月20日提出の特許第1575167号外98件  
にかか一般承継による特許権の移転登録申請書  
【物件名】 委任状 1

【物件名】

委任状

【添付書類】 125



委 任 状



私は、

識別番号 100075812 弁理士 吉 武 賢 次 氏  
を代理人と定めて下記事項を委任する。

1. 別紙目録に記載の特許出願に関する出願人名義変更届をする件  
954件
2. 上記各項の手続を処理するため復代理人を選任及び解任する件

以 上

平成 / 5 年 / 1 月 / 9 日

住所又は居所 埼玉県和光市広沢2番1号  
氏名又は名称 独立行政法人 理化学研究所  
代 表 者 理事長 野 依 良 治



## 目 録 (1)

1. 特願昭63-235737	51. 特願平07-327372
2. 特願平05-044143	52. 特願平08-000652
3. 特願平05-127257	53. 特願平08-026368
4. 特願平05-127258	54. 特願平08-030850
5. 特願平05-213675	55. 特願平08-041279
6. 特願平05-306164	56. 特願平08-045903
7. 特願平05-328611	57. 特願平08-051604
8. 特願平05-336746	58. 特願平08-065715
9. 特願平06-035100	59. 特願平08-070071
10. 特願平06-061792	60. 特願平08-105667
11. 特願平06-061793	61. 特願平08-107784
12. 特願平06-069150	62. 特願平08-116473
13. 特願平06-097098	63. 特願平08-123475
14. 特願平06-111624	64. 特願平08-127005
15. 特願平06-121100	65. 特願平08-131746
16. 特願平06-145908	66. 特願平08-132846
17. 特願平06-158670	67. 特願平08-132854
18. 特願平06-158671	68. 特願平08-142676
19. 特願平06-165751	69. 特願平08-158078
20. 特願平06-165752	70. 特願平08-167401
21. 特願平06-181857	71. 特願平08-196331
22. 特願平06-235742	72. 特願平08-197050
23. 特願平06-238603	73. 特願平08-197051
24. 特願平06-244764	74. 特願平08-211946
25. 特願平06-248486	75. 特願平08-216506
26. 特願平06-252942	76. 特願平08-216508
27. 特願平06-268723	77. 特願平08-222352
28. 特願平06-293933	78. 特願平08-231066
29. 特願平06-301372	79. 特願平08-233442
30. 特願平06-323795	80. 特願平08-236685
31. 特願平06-324490	81. 特願平08-251410
32. 特願平06-507966 (不刊2002-12420)	82. 特願平08-262051
33. 特願平07-007185	83. 特願平08-302896
34. 特願平07-069255	84. 特願平08-308335
35. 特願平07-082880	85. 特願平08-308336
36. 特願平07-083142	86. 特願平08-311467
37. 特願平07-117933	87. 特願平08-315093
38. 特願平07-133487	88. 特願平08-317622
39. 特願平07-205141	89. 特願平08-320241
40. 特願平07-214659	90. 特願平08-506395
41. 特願平07-217276	91. 特願平09-002295
42. 特願平07-236185	92. 特願平09-010602
43. 特願平07-240684	93. 特願平09-019968
44. 特願平07-249244	94. 特願平09-019969
45. 特願平07-259922	95. 特願平09-019971
46. 特願平07-282716	96. 特願平09-024890
47. 特願平07-302793	97. 特願平09-028982
48. 特願平07-306004	98. 特願平09-046824
49. 特願平07-311711	99. 特願平09-049254
50. 特願平07-311715	100. 特願平09-053478

## 目録(2)

- |                   |                   |
|-------------------|-------------------|
| 101. 特願平09-054595 | 151. 特願平10-045434 |
| 102. 特願平09-056654 | 152. 特願平10-049499 |
| 103. 特願平09-057342 | 153. 特願平10-049867 |
| 104. 特願平09-058774 | 154. 特願平10-051489 |
| 105. 特願平09-067611 | 155. 特願平10-051490 |
| 106. 特願平09-074394 | 156. 特願平10-051491 |
| 107. 特願平09-080480 | 157. 特願平10-051492 |
| 108. 特願平09-082965 | 158. 特願平10-051493 |
| 109. 特願平09-091523 | 159. 特願平10-060740 |
| 110. 特願平09-091591 | 160. 特願平10-060741 |
| 111. 特願平09-091694 | 161. 特願平10-061896 |
| 112. 特願平09-096988 | 162. 特願平10-076139 |
| 113. 特願平09-099061 | 163. 特願平10-085207 |
| 114. 特願平09-099109 | 164. 特願平10-085208 |
| 115. 特願平09-104093 | 165. 特願平10-103083 |
| 116. 特願平09-119730 | 166. 特願平10-103115 |
| 117. 特願平09-129068 | 167. 特願平10-103671 |
| 118. 特願平09-134525 | 168. 特願平10-104093 |
| 119. 特願平09-147964 | 169. 特願平10-113493 |
| 120. 特願平09-155364 | 170. 特願平10-116378 |
| 121. 特願平09-159963 | 171. 特願平10-121456 |
| 122. 特願平09-163630 | 172. 特願平10-127520 |
| 123. 特願平09-163631 | 173. 特願平10-136198 |
| 124. 特願平09-171924 | 174. 特願平10-149603 |
| 125. 特願平09-175896 | 175. 特願平10-150494 |
| 126. 特願平09-180423 | 176. 特願平10-151245 |
| 127. 特願平09-189436 | 177. 特願平10-155838 |
| 128. 特願平09-198201 | 178. 特願平10-155841 |
| 129. 特願平09-208866 | 179. 特願平10-156104 |
| 130. 特願平09-221067 | 180. 特願平10-156108 |
| 131. 特願平09-228345 | 181. 特願平10-198313 |
| 132. 特願平09-230870 | 182. 特願平10-200280 |
| 133. 特願平09-253740 | 183. 特願平10-217132 |
| 134. 特願平09-256796 | 184. 特願平10-217180 |
| 135. 特願平09-271782 | 185. 特願平10-222837 |
| 136. 特願平09-291995 | 186. 特願平10-227939 |
| 137. 特願平09-297084 | 187. 特願平10-229591 |
| 138. 特願平09-307627 | 188. 特願平10-232520 |
| 139. 特願平09-308597 | 189. 特願平10-232590 |
| 140. 特願平09-309848 | 190. 特願平10-236009 |
| 141. 特願平09-327140 | 191. 特願平10-237485 |
| 142. 特願平09-327609 | 192. 特願平10-238144 |
| 143. 特願平09-328742 | 193. 特願平10-245293 |
| 144. 特願平09-360327 | 194. 特願平10-250598 |
| 145. 特願平10-002030 | 195. 特願平10-250611 |
| 146. 特願平10-010471 | 196. 特願平10-252128 |
| 147. 特願平10-014152 | 197. 特願平10-260347 |
| 148. 特願平10-015690 | 198. 特願平10-260416 |
| 149. 特願平10-024892 | 199. 特願平10-268791 |
| 150. 特願平10-043335 | 200. 特願平10-269859 |

## 目 録 (3)

201. 特願平10-272529	251. 特願平11-135137
202. 特願平10-280351	252. 特願平11-135482
203. 特願平10-308533	253. 特願平11-143429
204. 特願平10-309765	254. 特願平11-144005
205. 特願平10-311673	255. 特願平11-147097
206. 特願平10-311674	256. 特願平11-151099
207. 特願平10-311675	257. 特願平11-166247
208. 特願平10-314856	258. 特願平11-173839
209. 特願平10-315751	259. 特願平11-179278
210. 特願平10-338896	260. 特願平11-186052
211. 特願平10-338897	261. 特願平11-193235
212. 特願平10-338898	262. 特願平11-224269
213. 特願平10-338899	263. 特願平11-225060
214. 特願平10-352428	264. 特願平11-225832
215. 特願平10-354665	265. 特願平11-225839
216. 特願平10-363297	266. 特願平11-226176
217. 特願平10-363329	267. 特願平11-234800
218. 特願平10-506788	268. 特願平11-240325
219. 特願平10-532832	269. 特願平11-240910
220. 特願平10-535583	270. 特願平11-241737
221. 特願平11-008183	271. 特願平11-242438
222. 特願平11-013380	272. 特願平11-242490
223. 特願平11-015176	273. 特願平11-253851
224. 特願平11-031724	274. 特願平11-260947
225. 特願平11-035776	275. 特願平11-277759
226. 特願平11-046372	276. 特願平11-278976
227. 特願平11-055835	277. 特願平11-279324
228. 特願平11-055867	278. 特願平11-281632
229. 特願平11-055930	279. 特願平11-303976
230. 特願平11-056957	280. 特願平11-309616
231. 特願平11-057381	281. 特願平11-315036
232. 特願平11-057749	282. 特願平11-321282
233. 特願平11-058103	283. 特願平11-336079
234. 特願平11-061079	284. 特願平11-346467
235. 特願平11-061080	285. 特願平11-354563
236. 特願平11-064193	286. 特願平11-360274
237. 特願平11-064372	287. 特願平11-365899
238. 特願平11-064506	288. 特願平11-373483
239. 特願平11-065136	289. 特願平11-510791
240. 特願平11-074385	290. 特願平11-515324
241. 特願平11-081225	291. 特願2000-001783
242. 特願平11-090383	292. 特願2000-005221
243. 特願平11-091875	293. 特願2000-009363
244. 特願平11-103231	294. 特願2000-010516
245. 特願平11-104509	295. 特願2000-011147
246. 特願平11-106920	296. 特願2000-011623
247. 特願平11-124187	297. 特願2000-016518
248. 特願平11-130771	298. 特願2000-016622
249. 特願平11-130814	299. 特願2000-017112
250. 特願平11-130815	300. 特願2000-018612

## 目 録 (4)

- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| 301. 特願 2000-019195 | 351. 特願 2000-141763 |
| 302. 特願 2000-019528 | 352. 特願 2000-148843 |
| 303. 特願 2000-020067 | 353. 特願 2000-152455 |
| 304. 特願 2000-030321 | 354. 特願 2000-152469 |
| 305. 特願 2000-034109 | 355. 特願 2000-154484 |
| 306. 特願 2000-039082 | 356. 特願 2000-161895 |
| 307. 特願 2000-040355 | 357. 特願 2000-163122 |
| 308. 特願 2000-041927 | 358. 特願 2000-164584 |
| 309. 特願 2000-041929 | 359. 特願 2000-179723 |
| 310. 特願 2000-045318 | 360. 特願 2000-181281 |
| 311. 特願 2000-045855 | 361. 特願 2000-184259 |
| 312. 特願 2000-051488 | 362. 特願 2000-184295 |
| 313. 特願 2000-051650 | 363. 特願 2000-191007 |
| 314. 特願 2000-052040 | 364. 特願 2000-191265 |
| 315. 特願 2000-053707 | 365. 特願 2000-192332 |
| 316. 特願 2000-054949 | 366. 特願 2000-193817 |
| 317. 特願 2000-056093 | 367. 特願 2000-195384 |
| 318. 特願 2000-056879 | 368. 特願 2000-196991 |
| 319. 特願 2000-057564 | 369. 特願 2000-197022 |
| 320. 特願 2000-057565 | 370. 特願 2000-202801 |
| 321. 特願 2000-057566 | 371. 特願 2000-216457 |
| 322. 特願 2000-058133 | 372. 特願 2000-223714 |
| 323. 特願 2000-058282 | 373. 特願 2000-224970 |
| 324. 特願 2000-062316 | 374. 特願 2000-225486 |
| 325. 特願 2000-064142 | 375. 特願 2000-225864 |
| 326. 特願 2000-064209 | 376. 特願 2000-225978 |
| 327. 特願 2000-071119 | 377. 特願 2000-226361 |
| 328. 特願 2000-076122 | 378. 特願 2000-229191 |
| 329. 特願 2000-085874 | 379. 特願 2000-230551 |
| 330. 特願 2000-089078 | 380. 特願 2000-237165 |
| 331. 特願 2000-092693 | 381. 特願 2000-237166 |
| 332. 特願 2000-100395 | 382. 特願 2000-237533 |
| 333. 特願 2000-105139 | 383. 特願 2000-246309 |
| 334. 特願 2000-105917 | 384. 特願 2000-248331 |
| 335. 特願 2000-107180 | 385. 特願 2000-249232 |
| 336. 特願 2000-108409 | 386. 特願 2000-256149 |
| 337. 特願 2000-109638 | 387. 特願 2000-257080 |
| 338. 特願 2000-109954 | 388. 特願 2000-257083 |
| 339. 特願 2000-118361 | 389. 特願 2000-260030 |
| 340. 特願 2000-120874 | 390. 特願 2000-261233 |
| 341. 特願 2000-123634 | 391. 特願 2000-264743 |
| 342. 特願 2000-128431 | 392. 特願 2000-265344 |
| 343. 特願 2000-131049 | 393. 特願 2000-278502 |
| 344. 特願 2000-131050 | 394. 特願 2000-279557 |
| 345. 特願 2000-131745 | 395. 特願 2000-292422 |
| 346. 特願 2000-134427 | 396. 特願 2000-292832 |
| 347. 特願 2000-136551 | 397. 特願 2000-299812 |
| 348. 特願 2000-136572 | 398. 特願 2000-307464 |
| 349. 特願 2000-138977 | 399. 特願 2000-308248 |
| 350. 特願 2000-141566 | 400. 特願 2000-309581 |



## 目録(5)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 401. 特願2000-319775 | 451. 特願2001-071436 |
| 402. 特願2000-322056 | 452. 特願2001-072650 |
| 403. 特願2000-333311 | 453. 特願2001-072668 |
| 404. 特願2000-334686 | 454. 特願2001-072963 |
| 405. 特願2000-334969 | 455. 特願2001-073028 |
| 406. 特願2000-343912 | 456. 特願2001-074964 |
| 407. 特願2000-347398 | 457. 特願2001-074965 |
| 408. 特願2000-347865 | 458. 特願2001-077257 |
| 409. 特願2000-358121 | 459. 特願2001-078671 |
| 410. 特願2000-368566 | 460. 特願2001-084173 |
| 411. 特願2000-374626 | 461. 特願2001-089541 |
| 412. 特願2000-375090 | 462. 特願2001-091911 |
| 413. 特願2000-378421 | 463. 特願2001-092337 |
| 414. 特願2000-378942 | 464. 特願2001-116171 |
| 415. 特願2000-378950 | 465. 特願2001-124294 |
| 416. 特願2000-384771 | 466. 特願2001-124452 |
| 417. 特願2000-387016 | 467. 特願2001-127575 |
| 418. 特願2000-394815 | 468. 特願2001-127576 |
| 419. 特願2000-396445 | 469. 特願2001-135357 |
| 420. 特願2000-399940 | 470. 特願2001-137087 |
| 421. 特願2000-400336 | 471. 特願2001-138103 |
| 422. 特願2000-401110 | 472. 特願2001-142583 |
| 423. 特願2000-401245 | 473. 特願2001-147081 |
| 424. 特願2000-401258 | 474. 特願2001-152364 |
| 425. 特願2000-503838 | 475. 特願2001-152379 |
| 426. 特願2000-571733 | 476. 特願2001-153447 |
| 427. 特願2000-571943 | 477. 特願2001-155572 |
| 428. 特願2000-602588 | 478. 特願2001-163740 |
| 429. 特願2000-602900 | 479. 特願2001-164819 |
| 430. 特願2000-618709 | 480. 特願2001-164997 |
| 431. 特願2001-003476 | 481. 特願2001-165133 |
| 432. 特願2001-005615 | 482. 特願2001-167910 |
| 433. 特願2001-007979 | 483. 特願2001-168784 |
| 434. 特願2001-016626 | 484. 特願2001-171705 |
| 435. 特願2001-025030 | 485. 特願2001-173331 |
| 436. 特願2001-037141 | 486. 特願2001-174421 |
| 437. 特願2001-037147 | 487. 特願2001-174553 |
| 438. 特願2001-042501 | 488. 特願2001-175898 |
| 439. 特願2001-044933 | 489. 特願2001-178169 |
| 440. 特願2001-047762 | 490. 特願2001-179858 |
| 441. 特願2001-050645 | 491. 特願2001-180552 |
| 442. 特願2001-053550 | 492. 特願2001-180554 |
| 443. 特願2001-054717 | 493. 特願2001-187735 |
| 444. 特願2001-059115 | 494. 特願2001-197185 |
| 445. 特願2001-059892 | 495. 特願2001-197897 |
| 446. 特願2001-060848 | 496. 特願2001-200854 |
| 447. 特願2001-062703 | 497. 特願2001-201356 |
| 448. 特願2001-065799 | 498. 特願2001-202971 |
| 449. 特願2001-065917 | 499. 特願2001-203089 |
| 450. 特願2001-068285 | 500. 特願2001-206506 |

## 目録(6)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 501. 特願2001-206522 | 551. 特願2001-325367 |
| 502. 特願2001-206523 | 552. 特願2001-326872 |
| 503. 特願2001-209305 | 553. 特願2001-327853 |
| 504. 特願2001-212947 | 554. 特願2001-329023 |
| 505. 特願2001-216505 | 555. 特願2001-332168 |
| 506. 特願2001-220219 | 556. 特願2001-337467 |
| 507. 特願2001-226176 | 557. 特願2001-339396 |
| 508. 特願2001-228287 | 558. 特願2001-339593 |
| 509. 特願2001-228374 | 559. 特願2001-346035 |
| 510. 特願2001-235412 | 560. 特願2001-347316 |
| 511. 特願2001-235747 | 561. 特願2001-347637 |
| 512. 特願2001-238951 | 562. 特願2001-349614 |
| 513. 特願2001-241023 | 563. 特願2001-351730 |
| 514. 特願2001-243930 | 564. 特願2001-352189 |
| 515. 特願2001-246642 | 565. 特願2001-353038 |
| 516. 特願2001-249976 | 566. 特願2001-358446 |
| 517. 特願2001-254377 | 567. 特願2001-358581 |
| 518. 特願2001-254378 | 568. 特願2001-359710 |
| 519. 特願2001-255589 | 569. 特願2001-374928 |
| 520. 特願2001-256576 | 570. 特願2001-376591 |
| 521. 特願2001-257188 | 571. 特願2001-378767 |
| 522. 特願2001-261158 | 572. 特願2001-380473 |
| 523. 特願2001-266004 | 573. 特願2001-382537 |
| 524. 特願2001-266069 | 574. 特願2001-382539 |
| 525. 特願2001-266454 | 575. 特願2001-382599 |
| 526. 特願2001-267194 | 576. 特願2001-385258 |
| 527. 特願2001-267379 | 577. 特願2001-385512 |
| 528. 特願2001-267863 | 578. 特願2001-385513 |
| 529. 特願2001-272977 | 579. 特願2001-385538 |
| 530. 特願2001-273964 | 580. 特願2001-388116 |
| 531. 特願2001-276053 | 581. 特願2001-390122 |
| 532. 特願2001-279406 | 582. 特願2001-392087 |
| 533. 特願2001-280319 | 583. 特願2001-392088 |
| 534. 特願2001-285145 | 584. 特願2001-395196 |
| 535. 特願2001-291059 | 585. 特願2001-396120 |
| 536. 特願2001-292223 | 586. 特願2001-397762 |
| 537. 特願2001-292224 | 587. 特願2001-397998 |
| 538. 特願2001-293000 | 588. 特願2001-401139 |
| 539. 特願2001-293054 | 589. 特願2001-515803 |
| 540. 特願2001-293936 | 590. 特願2001-523852 |
| 541. 特願2001-294013 | 591. 特願2001-557672 |
| 542. 特願2001-298140 | 592. 特願2002-000993 |
| 543. 特願2001-298402 | 593. 特願2002-005746 |
| 544. 特願2001-307340 | 594. 特願2002-010344 |
| 545. 特願2001-309501 | 595. 特願2002-011558 |
| 546. 特願2001-309508 | 596. 特願2002-019752 |
| 547. 特願2001-309984 | 597. 特願2002-020329 |
| 548. 特願2001-310554 | 598. 特願2002-022499 |
| 549. 特願2001-313430 | 599. 特願2002-028046 |
| 550. 特願2001-319360 | 600. 特願2002-028109 |

## 目録(7)

601. 特願 2002-040151	651. 特願 2002-162157
602. 特願 2002-042829	652. 特願 2002-162211
603. 特願 2002-044340	653. 特願 2002-162365
604. 特願 2002-044840	654. 特願 2002-167759
605. 特願 2002-046188	655. 特願 2002-170068
606. 特願 2002-047799	656. 特願 2002-170902
607. 特願 2002-053190	657. 特願 2002-176435
608. 特願 2002-053575	658. 特願 2002-176583
609. 特願 2002-055272	659. 特願 2002-183722
610. 特願 2002-057253	660. 特願 2002-185966
611. 特願 2002-057565	661. 特願 2002-187362
612. 特願 2002-057935	662. 特願 2002-187957
613. 特願 2002-057963	663. 特願 2002-188281
614. 特願 2002-066249	664. 特願 2002-189265
615. 特願 2002-070624	665. 特願 2002-194627
616. 特願 2002-070987	666. 特願 2002-197812
617. 特願 2002-071924	667. 特願 2002-201443
618. 特願 2002-074902	668. 特願 2002-201575
619. 特願 2002-078164	669. 特願 2002-202118
620. 特願 2002-081467	670. 特願 2002-205814
621. 特願 2002-081502	671. 特願 2002-205825
622. 特願 2002-083081	672. 特願 2002-217714
623. 特願 2002-084139	673. 特願 2002-221188
624. 特願 2002-085017	674. 特願 2002-225489
625. 特願 2002-087342	675. 特願 2002-225724
626. 特願 2002-094681	676. 特願 2002-226859
627. 特願 2002-095132	677. 特願 2002-227286
628. 特願 2002-095389	678. 特願 2002-229686
629. 特願 2002-100431	679. 特願 2002-230562
630. 特願 2002-106561	680. 特願 2002-235294
631. 特願 2002-119320	681. 特願 2002-235737
632. 特願 2002-120371	682. 特願 2002-236838
633. 特願 2002-123347	683. 特願 2002-237058
634. 特願 2002-128854	684. 特願 2002-237092
635. 特願 2002-133717	685. 特願 2002-248946
636. 特願 2002-133749	686. 特願 2002-253322
637. 特願 2002-134313	687. 特願 2002-253689
638. 特願 2002-141187	688. 特願 2002-253697
639. 特願 2002-141438	689. 特願 2002-254096
640. 特願 2002-142260	690. 特願 2002-257924
641. 特願 2002-149471	691. 特願 2002-260788
642. 特願 2002-149931	692. 特願 2002-261499
643. 特願 2002-150541	693. 特願 2002-264969
644. 特願 2002-154688	694. 特願 2002-267114
645. 特願 2002-154695	695. 特願 2002-268987
646. 特願 2002-154823	696. 特願 2002-270917
647. 特願 2002-158237	697. 特願 2002-271375
648. 特願 2002-158352	698. 特願 2002-271473
649. 特願 2002-160277	699. 特願 2002-273996
650. 特願 2002-162148	700. 特願 2002-274469

## 目録(8)

701. 特願 2002-276051	751. 特願 2003-012738
702. 特願 2002-282746	752. 特願 2003-012774
703. 特願 2002-286487	753. 特願 2003-015968
704. 特願 2002-289209	754. 特願 2003-016044
705. 特願 2002-295332	755. 特願 2003-016940
706. 特願 2002-296911	756. 特願 2003-017397
707. 特願 2002-299429	757. 特願 2003-021499
708. 特願 2002-301875	758. 特願 2003-024347
709. 特願 2002-303838	759. 特願 2003-024620
710. 特願 2002-312131	760. 特願 2003-025277
711. 特願 2002-320102	761. 特願 2003-027647
712. 特願 2002-320704	762. 特願 2003-027648
713. 特願 2002-325909	763. 特願 2003-031882
714. 特願 2002-325920	764. 特願 2003-032932
715. 特願 2002-332232	765. 特願 2003-038206
716. 特願 2002-339344	766. 特願 2003-040642
717. 特願 2002-339392	767. 特願 2003-043961
718. 特願 2002-339541	768. 特願 2003-050153
719. 特願 2002-339551	769. 特願 2003-050446
720. 特願 2002-341195	770. 特願 2003-052520
721. 特願 2002-343807	771. 特願 2003-052602
722. 特願 2002-344279	772. 特願 2003-052613
723. 特願 2002-345597	773. 特願 2003-052877
724. 特願 2002-347401	774. 特願 2003-053023
725. 特願 2002-348760	775. 特願 2003-054182
726. 特願 2002-349042	776. 特願 2003-054798
727. 特願 2002-354594	777. 特願 2003-054799
728. 特願 2002-357768	778. 特願 2003-054846
729. 特願 2002-357900	779. 特願 2003-054847
730. 特願 2002-358019	780. 特願 2003-054848
731. 特願 2002-358967	781. 特願 2003-054849
732. 特願 2002-360972	782. 特願 2003-055452
733. 特願 2002-360975	783. 特願 2003-056628
734. 特願 2002-368112	784. 特願 2003-061426
735. 特願 2002-376555	785. 特願 2003-063532
736. 特願 2002-376774	786. 特願 2003-065013
737. 特願 2002-376831	787. 特願 2003-071028
738. 特願 2002-379214	788. 特願 2003-072979
739. 特願 2002-380624	789. 特願 2003-074168
740. 特願 2002-381888	790. 特願 2003-076107
741. 特願 2002-382170	791. 特願 2003-078999
742. 特願 2002-383870	792. 特願 2003-079598
743. 特願 2002-521644	793. 特願 2003-079613
744. 特願 2002-532458	794. 特願 2003-082466
745. 特願 2002-546564	795. 特願 2003-083318
746. 特願 2002-548185	796. 特願 2003-083433
747. 特願 2002-570743	797. 特願 2003-083480
748. 特願 2003-003450	798. 特願 2003-085193
749. 特願 2003-012550	799. 特願 2003-089026
750. 特願 2003-012694	800. 特願 2003-090331

## 目録(9)

- |                    |                    |
|--------------------|--------------------|
| 801. 特願2003-091446 | 851. 特願2003-127135 |
| 802. 特願2003-092654 | 852. 特願2003-127150 |
| 803. 特願2003-093642 | 853. 特願2003-128818 |
| 804. 特願2003-094272 | 854. 特願2003-128897 |
| 805. 特願2003-094719 | 855. 特願2003-129347 |
| 806. 特願2003-095770 | 856. 特願2003-131313 |
| 807. 特願2003-095884 | 857. 特願2003-132280 |
| 808. 特願2003-095885 | 858. 特願2003-132605 |
| 809. 特願2003-095886 | 859. 特願2003-132606 |
| 810. 特願2003-095904 | 860. 特願2003-135591 |
| 811. 特願2003-097283 | 861. 特願2003-136445 |
| 812. 特願2003-097327 | 862. 特願2003-139397 |
| 813. 特願2003-101917 | 863. 特願2003-140684 |
| 814. 特願2003-104928 | 864. 特願2003-142303 |
| 815. 特願2003-105362 | 865. 特願2003-143932 |
| 816. 特願2003-107267 | 866. 特願2003-145221 |
| 817. 特願2003-107268 | 867. 特願2003-145390 |
| 818. 特願2003-107647 | 868. 特願2003-147820 |
| 819. 特願2003-107885 | 869. 特願2003-150690 |
| 820. 特願2003-109575 | 870. 特願2003-153014 |
| 821. 特願2003-115750 | 871. 特願2003-153015 |
| 822. 特願2003-115793 | 872. 特願2003-153016 |
| 823. 特願2003-115847 | 873. 特願2003-153985 |
| 824. 特願2003-115888 | 874. 特願2003-154009 |
| 825. 特願2003-116232 | 875. 特願2003-154841 |
| 826. 特願2003-116895 | 876. 特願2003-155397 |
| 827. 特願2003-118161 | 877. 特願2003-155407 |
| 828. 特願2003-118186 | 878. 特願2003-158017 |
| 829. 特願2003-119749 | 879. 特願2003-161005 |
| 830. 特願2003-119930 | 880. 特願2003-164126 |
| 831. 特願2003-120934 | 881. 特願2003-170051 |
| 832. 特願2003-121233 | 882. 特願2003-170324 |
| 833. 特願2003-121261 | 883. 特願2003-170325 |
| 834. 特願2003-121273 | 884. 特願2003-170326 |
| 835. 特願2003-121780 | 885. 特願2003-170327 |
| 836. 特願2003-122245 | 886. 特願2003-170328 |
| 837. 特願2003-123984 | 887. 特願2003-170329 |
| 838. 特願2003-124654 | 888. 特願2003-170330 |
| 839. 特願2003-124655 | 889. 特願2003-170573 |
| 840. 特願2003-124826 | 890. 特願2003-171576 |
| 841. 特願2003-124829 | 891. 特願2003-171619 |
| 842. 特願2003-124833 | 892. 特願2003-172898 |
| 843. 特願2003-124835 | 893. 特願2003-175819 |
| 844. 特願2003-125388 | 894. 特願2003-177298 |
| 845. 特願2003-125403 | 895. 特願2003-180198 |
| 846. 特願2003-125405 | 896. 特願2003-182958 |
| 847. 特願2003-127090 | 897. 特願2003-192763 |
| 848. 特願2003-127093 | 898. 特願2003-192775 |
| 849. 特願2003-127109 | 899. 特願2003-194837 |
| 850. 特願2003-127130 | 900. 特願2003-197229 |

## 目 録 (10)

- |                     |                     |
|---------------------|---------------------|
| 901. 特願 2003-198340 | 951. 特願 2003-338191 |
| 902. 特願 2003-204075 | 952. 特願 2003-339542 |
| 903. 特願 2003-205349 | 953. 特願 2003-340181 |
| 904. 特願 2003-205710 | 954. 特願 2003-342519 |
| 905. 特願 2003-206546 |                     |
| 906. 特願 2003-207698 |                     |
| 907. 特願 2003-207771 |                     |
| 908. 特願 2003-207772 |                     |
| 909. 特願 2003-207850 |                     |
| 910. 特願 2003-270049 |                     |
| 911. 特願 2003-271473 |                     |
| 912. 特願 2003-272421 |                     |
| 913. 特願 2003-275055 |                     |
| 914. 特願 2003-277958 |                     |
| 915. 特願 2003-279130 |                     |
| 916. 特願 2003-283972 |                     |
| 917. 特願 2003-284055 |                     |
| 918. 特願 2003-286640 |                     |
| 919. 特願 2003-289138 |                     |
| 920. 特願 2003-293912 |                     |
| 921. 特願 2003-296474 |                     |
| 922. 特願 2003-298558 |                     |
| 923. 特願 2003-299424 |                     |
| 924. 特願 2003-303979 |                     |
| 925. 特願 2003-304452 |                     |
| 926. 特願 2003-304453 |                     |
| 927. 特願 2003-305689 |                     |
| 928. 特願 2003-305844 |                     |
| 929. 特願 2003-306137 |                     |
| 930. 特願 2003-307564 |                     |
| 931. 特願 2003-313014 |                     |
| 932. 特願 2003-315355 |                     |
| 933. 特願 2003-318801 |                     |
| 934. 特願 2003-321497 |                     |
| 935. 特願 2003-322948 |                     |
| 936. 特願 2003-324974 |                     |
| 937. 特願 2003-326510 |                     |
| 938. 特願 2003-327645 |                     |
| 939. 特願 2003-327907 |                     |
| 940. 特願 2003-328600 |                     |
| 941. 特願 2003-328840 |                     |
| 942. 特願 2003-330418 |                     |
| 943. 特願 2003-330569 |                     |
| 944. 特願 2003-331848 |                     |
| 945. 特願 2003-332756 |                     |
| 946. 特願 2003-333798 |                     |
| 947. 特願 2003-333932 |                     |
| 948. 特願 2003-334036 |                     |
| 949. 特願 2003-334083 |                     |
| 950. 特願 2003-336365 |                     |

## 認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-339542
受付番号	20308550945
書類名	出願人名義変更届（一般承継）
担当官	小松 清 1905
作成日	平成16年 3月26日

## &lt;認定情報・付加情報&gt;

## 【提出された物件の記事】

【提出物件名】	委任状（代理権を証明する書面）	1
---------	-----------------	---

特願 2003-339542

出願人履歴情報

識別番号

[000006792]

1. 変更年月日

1990年 8月28日

[変更理由]

新規登録

住所

埼玉県和光市広沢2番1号

氏名

理化学研究所



特願 2003-339542

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[501293666]

1. 変更年月日

2002年 3月26日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都港区三田1丁目3番35号

氏 名

株式会社ダナフォーム

特願 2 0 0 3 - 3 3 9 5 4 2

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 5 0 3 3 5 9 8 2 1 ]

1. 変更年月日

2 0 0 3 年 1 0 月 1 日

[変更理由]

新規登録

住 所

埼玉県和光市広沢 2 番 1 号

氏 名

独立行政法人理化学研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☒ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**